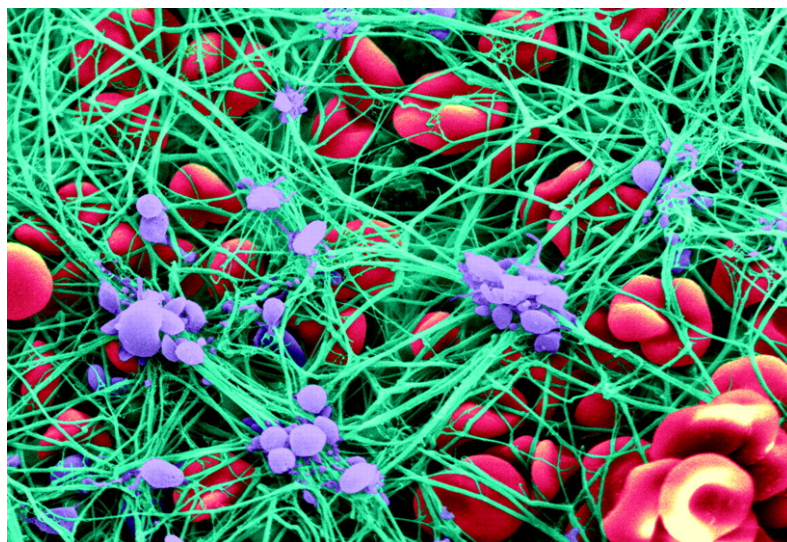


MTA Doktori értekezés

A trombolízis enzimológiai alapjai



Kolev Kraszimir

Semmelweis Egyetem
Orvosi Biokémiai Intézet



Budapest

2008

Tartalomjegyzék

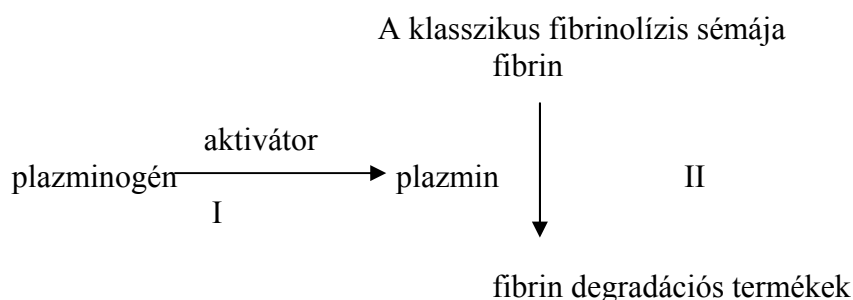
1. Bevezetés.....	3
1.1. A trombolízis szubsztrátja: a fibrin háló.....	4
1.2. A klasszikus fibrinolízis enzimei.....	7
1.2.1. Plazminogén és plazmin.....	7
1.2.2. Plazminogén aktivátorok.....	8
1.3. A fibrinolízis inhibitor rendszere.....	9
1.4. A trombolízis hemodinamikai aspektusai.....	11
1.5. A trombolízis celluláris tényezői.....	12
2. Célkitűzések.....	14
3. Módszerek.....	15
3.1. A fibrinoldás követése.....	15
3.1.1. Turbidimetria.....	15
3.1.2. Oldékony fibrin degradációs termékek detektálása.....	16
3.2. Plazmin aktivitás vizsgálata homogén rendszerekben.....	17
3.3. Plazminogén aktiváció vizsgálata.....	17
3.3.1. Plazminogén aktiváció fibrin jelenlétében.....	17
3.3.2. Plazminogén aktiváció homogén rendszerekben.....	18
3.4. Intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálata.....	18
3.4.1. Jelölt fehérjék felhasználásán alapuló módszerek.....	18
3.4.2. Surface plasmon resonance (SPR).....	19
3.4.3. Izoterm titrálási kalorimetria (ITC).....	19
3.5. Morfológiai vizsgálatok.....	20
3.5.1. Trombusok egyes komponenseinek azonosítása.....	20
3.5.2. Fibrin fázishatár-rétegének vizsgálata.....	20
3.6. Statisztikai értékelés.....	20
4. Eredmények és azok megbeszélése.....	22
4.1. Proteázok hatékonysága fibrinfelszín emésztésében.....	22
4.2. Kringle domének funkcionális jelentősége a plazmin aktivitásában fibrinogénen és fibrinen.....	30
4.3. PMN-elasztáz in vivo hatásának következményei a vérplazma fibrinolitikus potenciáljának tekintetében.....	34
4.4. Fibrinolízis perfúziós modellben.....	36
4.5. tPA által katalizált plazminogén aktiváció modulátorai.....	42
4.5.1. Denaturált protrombin.....	42
4.5.2. Denaturált albumin.....	45
4.5.3. Plazminogén kovalens módosítása metilglioxállal.....	50
4.6. A miozin fibrinolízist moduláló szerepe.....	52
4.7. Fibrinolízis lipid környezetben.....	62
4.7.1. Plazminogén aktiváció és plazmin aktivitás foszfolipidek jelenlétében.....	62
4.7.2. Fibrinolízis szabad zsírsavak jelenlétében.....	72
4.7.3. Plazmin gátlása szabad zsírsavakkal.....	79
4.8. IgG modulátor szerepe a fibrinolitikus enzimek működésében.....	89
5. Következtetések, az új eredmények összefoglalása.....	97
6. Köszönetnyilvánítás.....	100

7. Rövidítések jegyzéke.....	101
8. Saját publikációk.....	102
8. 1. A kandidátusi fokozat megszerzése óta megjelent közlemények	102
8.1.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	102
8.1.2. Az értekezésben nem tárgyalt közlemények	103
8.2. A kandidátusi fokozat megszerzése előtt megjelent közlemények	104
9. Irodalom	106
10. Mellékletek: Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	118

1. Bevezetés

Világszerte a szív- és agyér-betegségek jelentik a legkomolyabb népegészségügyi problémákat. Az Egészségügyi Világszervezet legfrissebb adatai szerint az atherothrombosissal kapcsolatos halálozás felelős az összes haláleset 22,3 %-áért a világon (és több mint 50 %-áért Európában) megelőzve a fertőző (19,1 %) és daganatos betegségeket (12,5 %) [1]. A fejlett országokban a halálozási statisztikák bizonyos javulást mutatnak az utóbbi 1 – 2 évtizedben és ez részben a szívinfarktus és ischaemiás stroke trombolitikus kezelésének tulajdonítható, amelynek alapja az artériákat elzáró trombusok gyors oldása és a vérkeringés helyreállítása [2,3]. Ez a terápiás eljárás plazminogén aktivátorok (urokináz, streptokináz, szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA) és rekombináns változatai) alkalmazásán alapszik, amelyek a trombusok felszínén vagy belsejében a vérplazma eredetű plazminogént plazminná alakítják és az utóbbi proteolitikus hasítással feloldja a trombusok fibrinrostokból álló vázát. Trombolízis után azonban az elzárt erek tartós rekanalizációja gyakran (az esetek 15 – 40 %-ában) elmarad, a trombolitikumok hatásos dózisa mellett pedig jelentős vérzéses szövődeményekkel kell számolni [4]. A felvázolt orvosi probléma egy általános enzimológiai kérdésre vezethető vissza: milyen tényezőktől függ egy proteáz (ebben az esetben plazmin) aktivitása egy adott *in vivo* kompartmentben (a trombusban).

Mivel a trombus feloldásához elegendő a fibrinrostok hasítása, enzimológiai szempontból célszerűnek tűnik a trombolízis folyamatát fibrinolízisként leegyszerűsíteni és vizsgálni az alábbi séma szerint [XIII]:



E séma kényelmes eszközt kínál arra, hogy két jól elkülönült, proteáz-katalizálta reakcióként vizsgáljuk a fibrinolízist: (I) plazminogén aktiváció limitált proteolízis eredményeként plazminogén aktivátorok (PA) hatására és (II) a szerkezeti fehérje (a fibrin) lebontása fibrin degradációs termékekké (FDP) plazmin hatására. A klasszikus felfogás szerint a rendszer specificitása azon alapszik, hogy az (I) lépés szubsztrátja (plazminogén) és enzimje (pl. tPA) hatékony aktivációs komplexet hoz létre

A fibrin polimerizáció e kezdeti lépése után a trombin a B β -lánc 14 aminosavból álló N-terminális peptidjét is lehasítja („B-gomb” keletkezik), ami a protofibrilek laterális tapadását is lehetővé teszi kötegekké (fibrinrostokká), valamint a rostok elágazódását, térbeli fibrin hálót létrehozva ezzel. Az így keletkező fibrinrostok végső átmérője a 100 – 200 nm közötti tartományra esik, míg az elágazódások által bezárt pórusok átmérője 0,1 μ m körüli a tömött gélekben, a laza szerkezetű gélben pedig az 5 μ m-t is eléri [10,11]. A hálót alkotó rostokon belül is maradnak a gél pórusait kitöltő folyadék fázis számára átjárható csatornák, amelyek a direkt szerkezeti vizsgálatok tanúsága szerint a rostkeresztmetszet 70 – 80 %-át foglalják el [12-14]. Ha figyelembe vesszük, hogy a fibrinolízisben szereplő fehérjék molekulatömege 50 – 90 kDa nagyságrendű (ld. következő fejezet), ami hidratált globuláris molekulák esetén 10 nm körüli átmérőt feltételez [15], ez azt jelenti, hogy a roston belüli csatornák kapillárisokként viselkednek, amelyek lehetővé teszik e fehérjék szabad mozgását a hosszanti tengely mentén, de korlátozzák a keresztirányú diffúziót. Ugyanakkor a gél pórusai nem jelentenek térbeli akadályt az akár 470 kDa molekulatömegű fehérjék diffúziójában sem [16]. A polimerizált fibrin végső szerkezete (rostátmérő, elágazási pontok közötti távolság, pórusok mérete) viszonylag limitált számú tényezőtől függ, amikor ideális rendszerekben vizsgálják (fibrinogén és trombin híg oldatainak felhasználásával): az egymást követő lépések (peptidkötések hidrolízise, polimerizációs kölcsönhatások) klasszikus enzimológiai determinánsai (a szubsztrát és az enzim koncentrációi). *In vivo* a legnagyobb ingadozás (több nagyságrend) talán a trombin koncentráció vonatkozásában várható, mivel aktivitását komplex mechanizmusok szabályozzák. Amikor a fibrinogént emelkedő trombin koncentrációval alakítják át fibrinné, a fibrinrostok átmérője folyamatosan nő 200 nm-ig (1 nM trombin mellett), míg a trombin koncentrációját tovább emelve a rostok átmérője fokozatosan csökken 100 nm-re (40 nM trombin mellett) [10]. Vérplazma környezetben is hasonlóan befolyásolja a trombin koncentráció változtatása a fibrinszerkezetet [17,18]. A fibrinogén koncentrációja sokkal szűkebb határok között ingadozik a vérplazmában (5 – 20 μ M), de még így is érinti a fibrin szerkezetet [10].

Az *in vivo* szituáció azonban ennél sokkal komplikáltabb. A vérplazmában zajló reakciókat nem lehet minden esetben sikeresen leegyszerűsíteni az egyensúlyi és kinetikai paraméterekre, amelyeket *in vitro* híg ideális oldatokban határozzunk meg, hiszen a plazma kompartmentben más, a vizsgált reakció szempontjából látszólag inert makromolekulák is elfoglalják a rendelkezésre álló térfogatot és így megváltoztatják a szubsztrátok és enzimek fizikokémiai viselkedését [19]. Erre a jelenségre vezethető vissza az a tény, hogy plazma környezetben a fibrinogén úgy vesz részt reakciókban (pl. trombin-katalizálta

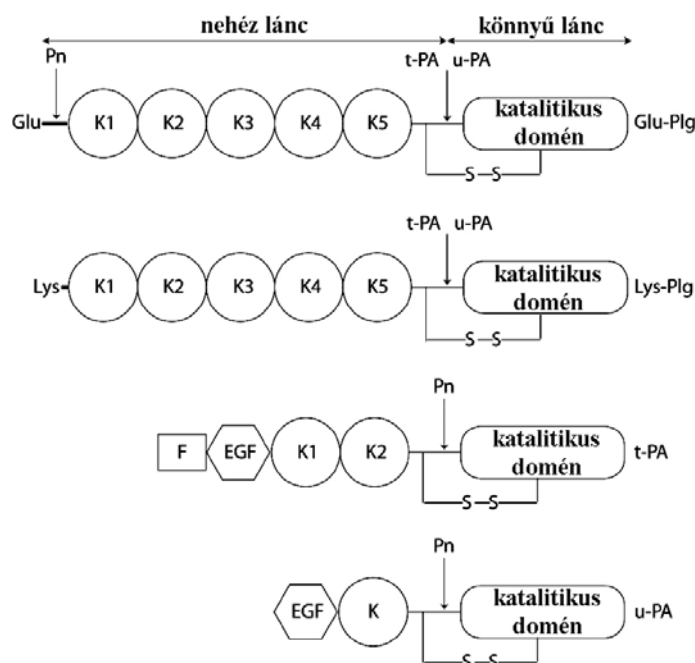
hidrolízisben) vagy kötődésekben (pl. vérlemezkéhez), mint a tízszer nagyobb koncentrációjú ideális oldata [20]. Ennek következtében az inert makromolekulák jelenlétében keletkező fibrin háló morfológiája várhatóan különbözik az egyéb molekulák „tömegétől” mentes körülmények között létrejövő fibrinétól. Ez az elméleti feltételezés igazolást nyert olyan fehérjék esetében, amelyek magas koncentrációban találhatók a vérplazmában: albumin [21,22], immunoglobulinok [23-27]. A molekulák térfoglaló tömeghatásának egy további fizikokémiai következménye a fibrinogén molekulák asszociációja vérplazmában. Szedimentációs egyensúlyi vizsgálatok bizonyítják, hogy 40 g/l albumin mellett a fibrinogén elsősorban homodimer formában van jelen oldatban [20]. Ez a megfigyelés további magyarázatot szolgáltat a rendkívül változatos fibrin szerkezetekre, amelyek keletkeznek *in vivo*. A fibrinogén nemcsak homodimereket képez, de egyéb plazma fehérjéket is megköt (plazminogén, XIII-as faktor, apolipoprotein(a), α_2 -makroglobulin, β -trombomodulin, transzferrin, fibronectin, tromboszpondin, hialuronát) [28]. Ezek közül a XIII-as faktor jól körülírt szerepet tölt be a fibrin szerkezet kialakításában. Miután a trombin aktiválja, a F-XIIIa γ -glutamil- ϵ -aminolizin kovalens kötéseket létesít az egymáshoz kötődő fibrin monomerek γ -láncain (**1. ábra**), valamint később az α -láncok között is, aminek következménye a plazminra érzékeny peptid kötések lassabb hidrolízise a fibrin oldás során [29-31]. A plazma F-XIII-nak e funkcióját a vérlemezkék is serkentik katalitikus felszín biztosításával [32], illetve kisebb mértékben saját transzglutamináz tartalmukkal. A jelen értekezésben tárgyalt saját vizsgálataink jelentős része arra irányult, hogy olyan tényezőket azonosítsunk a fibrin keletkezés stádiumában, amelyek a szubsztrát architektúrája útján döntően befolyásolják későbbi enzimátikus oldását [VII,VIII,IX,XI,XII].

Összefoglalva, a fibrinogén – fibrin átalakulás végeredménye egy rendkívül heterogén belső szerkezetű, gél-fázisú háló. *In vivo* a heterogenitás fokát növeli a vérlemezkék jelenléte a trombusokban, hiszen azáltal, hogy a glikoprotein IIb/IIIa révén a fibrinhez kötődnek, a trombociták nagyobb rostsűrűségű területeket hoznak létre [33], ahogy az a címlapon levő ábrán a lilával színezett vérlemezkék körül is megfigyelhető (az ábra John Weisel pásztázó elektronmikroszkópos felvétele trombusról, amelyet a szerző utólag beszínezett). A trombus-szerkezet vérlemezkéhez kötődő további aspektusainak tisztázásához a jelen értekezésben ismertetett saját eredményeink is hozzájárulnak [X].

1.2. A klasszikus fibrinolízis enzimei

1.2.1. Plazminogén és plazmin

Az emberi plazminogén egy 92 kDa molekulatömegű egyláncú glikoprotein, amelyet a máj termel és a vérplazmába szecernál, ahol koncentrációja 2 μ M körül van. Az összes plazminogén aktivátor az Arg561 és Val562 közötti peptid kötést hasítja a plazminogénben. Az így keletkező két polipeptidlánc, amelyet két diszulfid híd köt össze, alkotja a proteolitikus aktivitással rendelkező plazmin molekuláját (2. ábra).



2. ábra: A plazminogén/plazminogén aktivátor rendszer egyes komponenseinek moduláris szerkezete.

Rövidítések: Plg, plazminogén; Pn, plazmin; t-PA, szöveti típusú plazminogén aktivátor; u-PA, urokináz; K, kringle; F, fibronectin ujj domén; EGF, epidermális növekedési faktor domén. A nyilak a hasítási helyeket jelölik.

Az emberi plazminogén natív formája glutaminsavat tartalmaz az N-terminális végén (Glu-plazminogén), de a plazmin képes néhány peptidkötés hasítására a molekula e részében (Arg68, Lys77, Lys78 mellett). Az így keletkező rövidebb zimogén származékok közös néven Lys-plazminogénként ismertek. A Glu-plazminogén zárt konformációval rendelkezik, amely kevésbé hozzáférhető a plazminogén aktivátorok számára [34-36]. Az N-terminális (pre-aktivációs) peptid eltávolítása konformáció-változással jár [37], amelynek funkcionális következményei vannak (könnyebb aktiválhatóság, erősebb kötődés fibrinhez) [38]. A plazminogén szerkezetében a pre-aktivációs peptidet öt kringle domén követi (mindegyik kb. 80 aminosavból áll, 2. ábra), amely lizin oldalláncokat ismer fel kötőhelyként szubsztrátokban, inhibitorokban és sejtfelszíni receptorokban [39-42]. Ezek közül az 5. kringle rendelkezik legnagyobb affinitással a láncon belüli lizin iránt az intakt fibrinben [43-45], így hozzájárul a kezdeti plazminogén-fibrin komplex kialakulásához. Az

1.-3. kringle és különösen a 4. kringle előnyben részesíti a fibrin emésztése során újonnan hozzáférhetővé váló C-terminális lizin oldalláncokat [46,47], így növelve a plazminogén mennyiségét a fibrin hálóban. ω -Aminokarboxilsavak kötődése a kringle doménekhez alapvetően megváltoztatja a plazminogén molekula konformációját, így maximális hosszanti mérete 15-ről 24 nm-re növekszik [48]. Amikor a plazminogén felveszi ezt a nyitott konformációt, hozzáférhetővé válik bizonyos plazminogén aktivátorok számára [49] ugyanúgy, mint a pre-aktivációs peptid eltávolítása után. A plazminogén fibrinhez történő kötődése hasonló konformációs következményekkel járhat, de direkt szerkezeti adatok hiányában ezt az analógiát egyelőre csak egy hipotetikus lehetőségként kell kezelni.

A katalitikus domén követi a kringle doméneket a plazminogén szerkezetében, 230 aminosavból áll és szekvencia homológiát mutat a tripszinnel. Az ebben a doménben elhelyezkedő aktív centrum csak a kétláncú plazminban veszi fel aktív konformációját és végrehajtja néhány Lys melletti peptid kötés hidrolízisét a fibrinogén A α -, B β - és γ -láncokban, amely révén a fibrinogén molekula két fő végtermékké bomlik: E fragmentum (a molekula kb. 50 kDa tömegű központi doménje) és D fragmentum (a két kb. 100 kDa molekulatömegű oldalsó domén) [50]. A plazmin ugyanazokat a peptid kötéseket hidrolizálja a fibrinben is, de a monomerek közötti izopeptid kötések miatt D-dimerek is keletkeznek. A fibrin teljes feloldásához elegendő az összes E fragmentum – D fragmentum összeköttetés 25 %-át megszüntetni, mert már ilyen emésztettségi állapotban is eltérő nagyságú, de már vízzoldékony termékek keletkeznek [51]. Így az F-XIIIa által létrehozott kovalens keresztkötések mind a végtermékek méreteloszlását, mind a lízis sebességét [31] befolyásolják. Mivel a keresztkötött fibrin plazmin rezisztenciájának szerkezeti háttere tisztázatlan, az értekezésben tárgyalt vizsgálatok egy részénél kinetikai analízissel közelítettük meg e rezisztencia funkcionális aspektusait [II]. Bár a plazmin kringle domének és a katalitikus domén közötti intramolekuláris kölcsönhatások ismertek [38,52], ezek jelentősége a plazmin katalitikus hatékonysága szempontjából bizonytalan volt. Így kinetikai vizsgálatainkkal ezt a kérdést is megcéloltuk [IV]. Továbbá a plazmin katalitikus hatékonyságát olyan modulátorok mellett is meghatároztuk (immunoglobulinok, szabad zsírsavak), amelyek fiziológiás és patológiás jelentőségére először saját vizsgálatainkból derült fény [VII,XVII,XIX].

1.2.2. Plazminogén aktivátorok

A tPA 68 kDa molekulatömegű, egyláncú glikoprotein, amelyet főleg az endothel sejtek termelnek és a vérplazmába szecernálnak, ahol koncentrációja 0,06 nM körül van [53], de ennek csak 20 %-a található szabad formában, a többi komplexet képez

a fő plazma inhibitorával, PAI-1. A tPA terápiás alkalmazása során azonban koncentrációja akár 350 nM is lehet a vérben [54,55]. A tPA N-terminális része fibronektinszerű „finger” doménból és epidermális növekedési faktorszerű EGF doménból áll (mindegyik kb. 40-40 aminosav), amelyet két kringle domén követ (mindegyik kb. 80-80 aminosav) (**2. ábra**). A molekula C-terminális része a katalitikus domén, amely szerkezetében a tripszinszerű szerin proteázokra hasonlít. A finger domén elsősorban az intakt fibrinhez kötődik, míg a 2. kringle domén inkább a fibrin lebontása során exponált C-terminális lizin oldalláncokhoz [56-59]. Annak ellenére, hogy az egyláncú tPA eléggé rendhagyó módon aktív enzim, fibrin nélkül rendkívül kis hatékonyságú aktivátor, de fibrin jelenlétében a plazminogén aktivációja jelentősen felgyorsul a hármas tPA-plazminogén-fibrin komplex kialakulása miatt [60-62]. Így a fibrin kofaktor funkciót tölt be a tPA által katalizált plazminogén aktivációban. Ennek fényében meglepő, hogy a retepláz (a tPA rekombináns változata, amely csak a 2. kringle és a katalitikus doménból áll és így nem mutat affinitást az intakt fibrin iránt [63]) terápiás alkalmazása során alacsonyabb dózisoknál is gyorsabb trombolízist eredményez azonos vagy kisebb vérzéses komplikációkkal a tPA-hoz képest [64]. Ez a tény arra hívja fel a figyelmet, hogy *in vivo* olyan modulátor hatások is érvényesülhetnek, amelyek módosítják a fibrin kofaktor szerepét. Ezért vizsgálataink során sok erőfeszítést tettünk az ismeretlen kofaktorok és kofaktor-modulátorok azonosítására [I,V,VI,IX,XVII].

Az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) 55 kDa molekulatömegű glikoprotein, amelyet több sejt (kötszöveti sejtek, hámsejtek, makrofágok, endothel sejtek) termel és 0,07 nM koncentrációban van jelen a vérplazmában [65]. A molekula EGF doménból (amely sejtfelszíni receptorokhoz kötődik), kringle doménból (amely nem köt lizint) és a tripszinszerű szerin proteázokra jellemző katalitikus doménból áll (**2. ábra**). Egyláncú formája nem rendelkezik katalitikus aktivitással (vagy egyes adatok szerint minimális aktivitást mutat), de a Lys158-Ile159 peptid kötés hasítása után (plazmin vagy kallikrein hatására) hatékony plazminogén aktivátorrá válik, amely nem igényel kofaktort. A plazminogén aktivációt módosító tényezők vizsgálatában e tulajdonsága miatt ezt a kétláncú formát (urokináz néven) alkalmaztuk, mert tPA-val összehasonlítva egyértelművé teszi a kofaktorokon keresztül érvényesülő hatások azonosítását.

1.3. A fibrinolízis inhibitor rendszere

A proteáz hatások megfelelő lokalizációja és időzítése a szervezetben nemcsak a zimogén aktivációjától, hanem döntően az endogén inhibitoroktól is függ. Ez az általános elv a fibrinolitikus enzimekre is érvényes, amelyek aktivitását elsősorban a vérplazmában

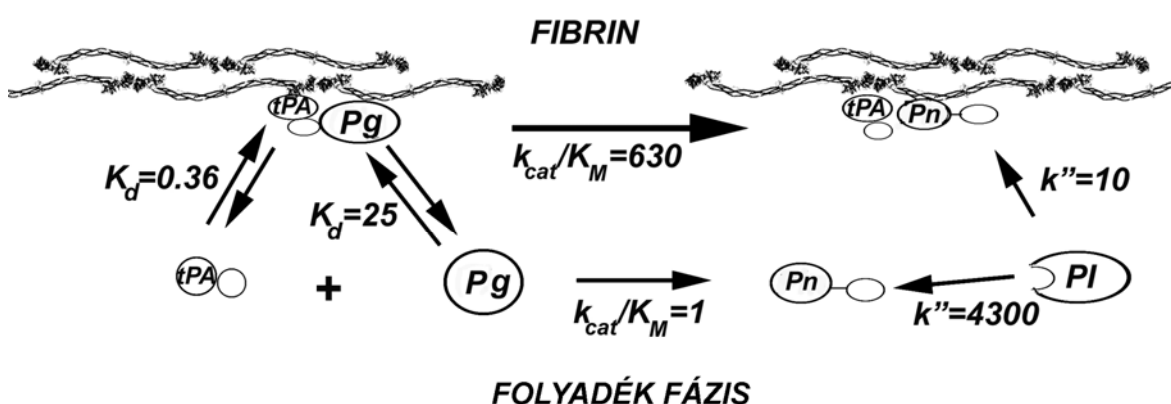
levő inhibitorok szabályozzák. Ezek az inhibitorok eltérő szerkezetűek, de mennyiségileg a szerpín család (szerín proteáz inhibitor) a legjelentősebb. A szerpínek egyláncú glikoproteinek, amelyek nehezen disszociáló, *in vivo* gyakorlatilag irreverzibilis komplexeket képeznek a proteázokkal [66,67].

Az α_2 -PI a szerpín családhoz tartozó 70 kDa molekulatömegű inhibitor, amelyet a máj termel és kb. 1 μ M-s koncentrációban van jelen a vérplazmában. Plazminnal az α_2 -PI rendkívül gyors reakcióban (másodrendű sebességi állandó $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ körül) lép kölcsönhatásba, amely részben a C-terminális fragmentuma és a plazmin 1. kringle doménje közötti interakciónak köszönhető [68]. Így a plazmin kringle doménjeinek eltávolítása, amely *in vivo* a neutrofil leukocita elasztáz által katalizált proteolízis következménye lehet, 1/5-ére csökkenti az interakció sebességi állandóját [XXX]. A plazmin aktivitás szempontjából még erősebb védelmet jelent, ha az enzim fibrinhez kötődött. Ilyen körülmények között az α_2 -PI csak 430-szor kisebb sebességi állandóval képes inaktiválni, és így fiziológiás α_2 -PI koncentráció mellett fibrin felszínén a plazmin fél-életideje 7 perc körül van (szemben az 1 másodperces értékkel oldatban) [XXX]. Az α_2 -PI fibrinolízisre gyakorolt hatásához hozzátartozik, hogy a F-XIIIa képes α_2 -PI-t kovalensen hozzákötni fibrinhez, de az ilyen módon immobilizált inhibitor csak a fibrin alvadékot kívülről megközelítő plazminnal szemben jelent védelmet [69]. A vérplazma további proteáz inhibitorokat tartalmaz mikromoláris koncentrációban (α_2 -makroglobulin, α_1 -proteáz inhibitor, antitrombin), de szerepük a fibrinolízisben eléggé kétséges tekintettel arra, hogy a fibrin teljes mértékben megszünteti plazminra gyakorolt hatásukat [XXX,XXXI]. Az α_1 -proteáz inhibitor (α_1 -PI) viszont számításba jön a polimorfonukleáris leukocita eredetű elasztáz (PMN-elasztáz) szabályozásánál, amelynek fibrinolízisben betöltött szerepét az 1.5. alfejezet tárgyalja.

A plazminogén aktivátor inhibitorok (PAI) olyan szerpínek, amelyek térben korlátozzák a plazminogén aktivációt olyan kompartmentekre, ahol a plazminogén aktivátor koncentrációja túlsúlyban van (pl. az aktivátor sejtből történő felszabadulása helyén) vagy az aktivátor védett a gátlással szemben (pl. mert kötődik kofaktorához). Ezek közül a PAI-1 vérplazma koncentrációja 5 nM-ig terjed, de vérben ennél nagyobb mennyiség található a trombocitákon belül, amely döntő szerephez jut a fibrinolízis idő előtti beindításának megakadályozásában, amikor a primer hemosztázis során a vérlemezkék aktiválódnak [70,71]. A PAI-2-t a F-XIIIa a fibrinhez izopeptid kötéssel köti hozzá az α_2 -PI-hoz hasonlóan és ennek következményei a szabályozott enzimatisz folyamatra nézve is hasonlóak. Ahogy a fibrinhez keresztkötött α_2 -PI védi a szubsztrátot

(fibrin) a szabad fázisból támadó proteázzal (plazmin) szemben, úgy a keresztkötött PAI-2 gátolja a plazminogén aktivációt olyan aktivátorral, amely szabad fázisban is hatásos (urokináz), de a kofaktorhoz kötött aktivátorral (tPA) zajló folyamatot már nem befolyásolja [72,73].

A szubsztrátok, enzimek és inhibitorok eddig tárgyalt viszonyát a **3. ábra** foglalja össze és egyben kvantitatív adatokkal támasztja alá a bevezetőben megfogalmazott tézist, amely szerint csak ezekkel a szereplőkkel nem lehet értelmezni a trombolízissel szembeni rezisztenciát, mert közöttük a fibrin kompartmenten belül is hatékonyan működő negatív visszacsatolás nem található meg. Az utóbbi 10 évben a hiányzó láncszemek kutatása több új elemet adott az alapfolyamatokhoz, így pl. a trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) felfedezése [76] vagy a munkacsoportunk által leírt modulátor hatások.



3. ábra: Fibrin hatásai a plazmin keletkezésére és gátlására. [XIII]

Rövidítések: Pg, plazminogén; Pn, plazmin; PI, α_2 -plazmin inhibitor.

A disszociációs állandó (K_d , μM) értéke tPA esetében [59], plazminogén esetében [74] referencia alapján került feltüntetésre. A katalitikus hatékonyságot jellemző arány k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) értéke a [75] referenciából származik. A plazmin gátlást jellemző másodrendű sebességi állandók (k'' , $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) saját adatok [XXX].

1.4. A trombolízis hemodinamikai aspektusai

Az előzőekben ismertetett fibrin szerkezet önmagában is meglehetősen heterogén környezetet tart fenn a trombolízis számára, amelynek csak egyes részlépéseire lehetne elfogadható egyszerűsítésként alkalmazni a klasszikus (homogén oldatokra kidolgozott) enzimológiai megközelítéseket. A teljes képhez *in vivo* az is hozzátartozik, hogy a trombolízis folyékony – szilárd fázishatáron zajlik, amelybe a vérkeringés hemodinamikai viszonyai között a diffúzió és perfúzió a fibrinolitikus komponensek ingadozó bejutását biztosítja. A trombusok anatómiai lokalizációja eltérő hemodinamikai körülményeket létesít. Egy artériás bifurkációhoz közel elhelyezkedő elzáró trombus sokkal nagyobb nyíróerőnek van kitéve, mint egy távolibb, kisebb artériás ágba vagy

vénás érszakaszban levő trombus. Így az első esetben a nagy nyomáskülönbség miatt a perfúzió, míg az utóbbiban a nyomáskülönbség hiányában a diffúzió határozza meg a keringő plazma-hordozta molekulák bejutását a trombusba. A két bejutási mód hatékonyságában számottevő különbségek léteznek. Annak ellenére, hogy a fibrin pórusmérete nem jelenthet diffúziós akadályt a fibrinolitikus enzimek méretével rendelkező molekulák számára [16], a fibrinolitikus enzimek fibrin gélbe történő diffúziója nagyon lassú, 1 cm axiális távolságot kb. 10 nap alatt tesznek meg [77]. Az alvadék belsejébe történő korlátozott penetráció hátterében a folyamatban résztvevő molekulák fibrin iránti affinitása valamint a közeg mikroszkopikus heterogenitása és az ebből adódó szabálytalan geometriájú áramlási pályák állnak [78]. Az anyagok szállításmódja az alvadékba nagymértékben megváltozik nyomás hatására. Az artériás keringésre jellemző áramlási viszonyok között a tPA-indukálta, urokináz-indukálta vagy a plazmin-katalizálta fibrinoldás sebessége 50-, 25-, illetve 10-szeresére nő a statikus állapothoz képest [78,79]. Ezen transzport jelenségek következtében még azonos zimogén és enzim koncentrációk mellett is egészen eltérő lehet a trombolízis lefolyása a különböző hemodinamikával rendelkező érszakaszokban. Azonos nyomás mellett további eltérések adódnak a fibrin gél térbeli szerkezetéből kifolyólag: a durva (nagy porozitású) fibrinbe történő anyagszállítás gyorsabb fibrinolízishez vezet, míg az ugyanilyen monomer koncentrációjú, de finomabb hálót képező fibrin oldása lassabb [78]. *In vivo* a véráram folyamatos utánpótlást biztosít plazminogénből és aktivátorokból a trombus felszínén, ahol ezek a fibrinhez kötődnek és jól körülhatárolt, 50 μ m körüli mélységű reaktív réteget képeznek, amelyben a plazmához képest koncentrációjuk többszörösére nő és plazmin is keletkezik [80]. Vizsgálatainkban ezeket a szempontokat is figyelembe vettük, amikor a fibrinolízis enzimeinek hatását modelleztük [II,III,VII,IX,X,XVI,XVII,XVIII].

1.5. A trombolízis celluláris tényezői

A fibrinhez tapadó vérlemezkék leukocitákat is mobilizálnak a keringő vérből (többségükben, 76 %-ban neutrofil PMN sejt) [81], és az adhézió aktiválja ezeket [82]. A neutrofil leukociták a trombusok oldásában betöltött szerepe mellett olyan transzgen egértörzsek fenotípusa szól, amelyekben a plazmin-függő fibrinolitikus rendszer egyes komponensei hiányoznak. A plazminogén knock-out egerek életképesek [83,84], de vénás vagy artériás trombózis indukciója után sokkal több PMN sejt jelenik meg a trombusokban mint a vad típusú állatokban, és a knock-out egerekből izolált neutrofil leukociták magasabb fibrinolitikus aktivitással rendelkeznek [85]. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a PMN sejtek legalább részben képesek kompenzálni a klasszikus

fibrinolízis zavarait és fiziológiás körülmények között egy kiegészítő rendszert alkotnak a véralvadékok feloldására. A PMN sejtek jelentősége a fibrin feloldásában régóta ismert [86] és ennek háttérében vagy fagocitózis [86], vagy PMN elasztázzal és katepszin G-vel történő extracelluláris proteolízis [87,88] állhat. Ezekből a tényekből kiindulva létrejött a nem-plazminos fibrinolízis koncepciója [87,89]. Korábbi vizsgálatainkkal azonban már kimutattuk, hogy legalábbis olyan modell rendszerben, amelyben a proteázok homogén eloszlást mutatnak a fibrin gélen belül, a PMN-elasztáz 8 – 20-szor kisebb katalitikus hatékonysággal rendelkezik a plazminhoz képest, míg a katepszin G 200 – 300-szor kevésbé hatékony a plazminnál [XXXIV]. Ezek szerint a PMN leukocitákból származó proteázok vagy speciális körülmények között juthatnak jelentős direkt fibrinolitikus szerephez (pl. heterogén rendszerben a fokális felszabadulásuk helyén), vagy közvetett módon járulhatnak hozzá a trombusok oldásához. Ez utóbbira több példa is létezik. Egyfelől a PMN-elasztáz néhány véralvadási faktort emészt (FV, FVII, FVIII, FIX, FXII, F-XIII) és így kevésbé stabil fibrin szerkezet jön létre (összefoglalva a [90] referenciában). Másfelől, mint már említésre került, a PMN-elasztáz peptid kötéseket hasít a plazminogén kringle doménjei között és így miniplazminogén (más néven des-kringle₁₋₄ plazminogén, azaz plazminogén, amelyben csak az 5. kringle van jelen) keletkezik [91]. A miniplazminogén könnyebben aktiválható mint a plazminogén és nem igényel kofaktort az aktivációhoz [92]. Továbbá, a PMN-elasztáz emészt és így inaktíválja az α_2 -PI-t, a plazmin-függő fibrinolízis fő negatív szabályozóját [93,94]. Összességében a felsorolt, *in vitro* nyert adatok alapján várható, hogy a PMN-elasztáz hatásai a fibrinolízis javára mozdítják el a véralvadás – fibrinolízis *in vivo* egyensúlyát. Kérdéses viszont, hogy ezek a hatások mennyire tudnak érvényesülni α_1 -PI jelenlétében, amely nemcsak rendkívül hatékony inhibitora a PMN-elasztáznak [XXX], hanem ráadásul magas ($\geq 40 \mu\text{M}$) koncentrációban is jelen van a vérben [67]. Az aktivált PMN sejtek közvetlen közelében a PMN-elasztáz hatásának kedvez, hogy a leukocitákból származó mieloperoxidáz eloxidálja az α_1 -PI reaktív centrumában levő Met₃₅₈-t, amelynek következtében az inhibitor inaktíválódik [95]. A PMN leukociták trombolitikus szerepével kapcsolatos, jelen értekezésben ismertetésre kerülő vizsgálataink egy részével azt próbáltuk tisztázni, hogy az ilyen ellentétes *in vivo* hatások mellett a PMN-elasztáz mennyire módosítja a fibrinolitikus potenciált [XI]. Korábbi homogén rendszerben végzett enzimológiai vizsgálatainkat pedig kiterjesztettük olyan *in vitro* modellekkel, amelyek elemzik a PMN-elasztáz aktivitását heterogén fázisban [II] és áramlás alatt [III] és így jobban tükrözik a trombolízis reális körülményeit. A trombusban levő sejtes elemek (vérlemezkék, leukociták) intracelluláris

fehérjéi (pl. aktin, miozin) és membrán foszfolipidei szintén potenciális modulátorként jönnek számításba a fibrinolízis folyamatában [IX,X,XVII].

2. Célkitűzések

Bár a bevezetésben már említésre került, hogy az ismertetett tudományos előzmények nyomán milyen irányba látszott célszerűnek továbbvinni a trombolízis-rezisztenciával kapcsolatos kutatásainkat, a célkitűzések alábbi felsorolása az értekezés áttekinthetőségét szolgálja, hiszen az eredmények is ilyen csoportosításban kerülnek bemutatásra. A kitűzött célok tágabb értelmezése megtalálható a mellékletként csatolt három összefoglaló cikkünkben [VIII,XIII,XIV].

1. A folyadék-fázisú fibrinbontó proteázok gél-fázisú szubsztráton kifejtett hatásának adekvát modellezése, amely lehetővé teszi katalitikus hatékonyságának jellemzését a fibrin és a proteáz szerkezet függvényében [II,IV,XI].

2. Fibrinolitikus proteázok hatékonyságának jellemzése áramlások modellekben, a nyíróerők hatása a fibrin enzimatis oldására [III,VII,IX].

3. A tPA-katalizálta plazminogén aktivációban szereplő alternatív kofaktorok azonosítása, a kofaktor hatás szerkezeti alapjának és módosításának vizsgálata [I,V,VI,XV].

4. A miozin fibrinolízist moduláló szerepének kvantitatív jellemzése mint a plazminogén aktiváció kofaktora, a trombus mátrix alkotóeleme és a proteázok alternatív szubsztrátja [I,IX,XVI].

5. Plazminogén aktiváció és plazmin aktivitás jellemzése olyan fibrinháló felületén, amely magába zár foszfolipideket vagy szabad zsírsavakat [X,XVII,XIX].

6. Immunoglobulin G (egészséges egyénektől vagy primér antifoszfolipid szindrómában (APS) szenvedő betegektől) hatásai a fibrin szerkezetre, plazminogén aktivációra és plazmin aktivitására [VII,XII,XVIII].

3. Módszerek

Az értekezésben ismertetett vizsgálatoknál alkalmazott módszerek részletes leírása megtalálható a mellékletben csatolt eredeti közleményekben. Ez a fejezet a módszerek elvi alapjait, illetve kritikai értékelésüket tartalmazza.

3.1. A fibrinoldás követése

3.1.1. Turbidimetria

Mivel a fibrinogén – fibrin átalakulás során olyan molekula-aggregátumok keletkeznek, amelyek mérete összevethető a fény hullámhosszával, a fibrinhálón áthaladó fény szóródik és az így alakuló turbiditás (opálosság) jelzi a fibrin keletkezését. Ráadásul a turbiditás arányos a fibrinrostok tömeg/hossz arányával [96], így a fibrin gélen áthaladó fény szórás miatt fellépő intenzitáscsökkenése a fibrinszerkezetről is információt hordoz (vastagabb fibrinrostok nagyobb turbiditást eredményeznek). Bár a jelenség nem hullámhossz-specifikus, kísérleteinkben 340 nm-nél mértük a fényintenzitás csökkenését (A_{340}), mert a szignál annál erősebb, minél rövidebb hullámhossznál dolgozunk, ugyanakkor ennél a hullámhossznál még a látható fénytartományban használható optikai eszközökkel lehet dolgozni. A már kialakult fibrin turbiditásának mérésével lehet a fibrinoldást nyomon követni [97-100]. A módszer számos előnnyel rendelkezik: 1) változatos összetételű fibrin alvadékot lehet használni (nemcsak tisztított fibrinogént, hanem teljes rekalcifikált vérplazmát is meg lehet trombinnal alvasztani, fibrinogénbe homogénen belekevert szelektált modulátor anyagokat lehet vizsgálni) [II,VII,IX-XII,XVI-XVIII], 2) a fibrinoldó proteázok különböző megközelítési útvonalaait lehet modellezni (a fibrinogén alvasztásával egy időben hozzáadott proteáz homogén eloszlású lesz az alvadékon belül, míg az előre elkészített fibrinre rárétegezett proteáz csak egy fázishatár rétegben fejti ki hatását) [II,IV,VII,IX-XI,XVI-XVIII], 3) a fibrinoldást nemcsak direkt fibrinolitikus proteázzal lehet indítani, hanem plazminogén aktivátorral is (amennyiben az alvadékhoz használt fibrinogén plazminogént is tartalmaz) [IX-XI,XVII,XVIII], 4) nagyszámú párhuzamos mérést lehet végezni 96 férőhelyes mikrolemezek leolvasására képes spektrofotométerrel (ami nem elhanyagolható előny a több órás követési idő tükrében). A módszer hátránya a kis érzékenysége a heterogén fázisban alkalmazott proteázokra (mivel az oldás csak egy vékony határrétegben történik, ilyen körülmények között csak jelentősen eltérő enzimkoncentrációk eredményeznek értékelhető oldási sebességekülönbségeket). A módszer alkalmazásánál azonban figyelembe kell venni, hogy amennyiben egzakt kinetikai paraméterek azonosítása a cél, a turbiditási értékeket

kalibrálni kell az intakt fibrin független módszerrel meghatározott mennyiségének függvényében, ahogy azt a [II] melléklet 2. ábrája illusztrálja.

3.1.2. Oldékony fibrin degradációs termékek detektálása

Amennyiben a fibrin oldása során a folyadékfázisban lévő fehérjét detektáljuk a 280 nm-nél mért abszorbancia (A_{280}) alapján, a nagyobb méretű fibrin degradációs termékek miatt az oldás különböző fázisaiban változó mértékű fényszórás is hozzáadódik a mért szignálhoz. E hátrány kiküszöbölésére a folyadékfázist 20 % etanollal kezeljük, amely mellett a nagyméretű termékek kicsapódnak és az oldatban maradó kisebb termékek A_{280} értékei alapján megbízhatóan nyomon tudjuk követni a fibrin emésztés kinetikáját [IV]. A módszer előnye, hogy mivel a natív fibrinogén is kicsapódik ilyen etanol koncentráció mellett, a fibrinogén-emésztés mérésére is mód nyílik, így a fibrinogént és a fibrint össze lehet hasonlítani mint egy adott proteáz szubsztrátja. Az eredmények értékelésénél azonban figyelembe kell venni, hogy ez a módszer szelektál a degradációs termékek közül és emiatt inkább a későbbi emésztési termékek keletkezéséről ad információt, ami nem mindig (pl. áramlás alatt) esik egybe a fibrin oldásával.

Az oldékony fibrin degradációs termékek detektálására a legérzékenyebb módszer a ^{125}I -jelölt fibrin alkalmazásán alapszik. Ehhez elegendő egy rétegben ^{125}I -jelölt fibrinogénnel bevonni polisztrén csöveket, trombinnal fibrinné alakítani a csőhöz tapadt fibrinogént és a fibrinolitikus proteáz alkalmazása után időben követni a felszabaduló radioaktivitást [II]. A módszer előnye, hogy megbízható a fibrin emésztés kezdeti lépéseinél is, hátránya viszont, hogy nem a természetes, polimerizált fibrin szubsztráton, hanem fibrin monomereken vizsgáljuk a proteázok hatását.

A fibrin degradációs termékek keletkezését áramlás alatt a III melléklet 1. ábráján bemutatott rendszerrel vizsgáltuk. Ezzel a perfúziós módszerrel egy henger alakú fibrin alvadék központi hosszanti tengelye mentén proteázokat áramoltatunk úgy, hogy a folyadékfázis szabályozott, 10 és 500 s^{-1} közötti nyírósebességet eredményez a fibrin felszínén és közben az áramló fázis fehérjetartalmát folyamatosan regisztráljuk A_{280} mérésével átfolyó fotométercellában. A módszer előnye, hogy különböző érszakaszokra jellemző áramlási viszonyok között tudjuk modellezni a trombolízist [III] és az alvadék összetételének változtatásával a trombus stabilitását befolyásoló tényezőket tudjuk vizsgálni [VII,IX]. A módszer hátránya, hogy idő- és munkaigényes, és így viszonylag kis számú minta vizsgálatára nyílik lehetőség.

A fibrin degradációs termékek méret szerinti azonosítására a fent felsorolt módszereket általában kiegészítettük gélelektroforézissel és autoradiográfiával.

3.2. *Plazmin aktivitás vizsgálata homogén rendszerekben*

Amennyiben a vizsgált modulátor molekulák stabil oldatot képeznek, a fibrinen mért plazminaktivitás vizsgálatát kiegészítettük kis molekulatömegű szintetikus peptidszubsztráton történő méréssel, amelyre alkalmazni lehet a klasszikus, homogén rendszerekre kidolgozott enzimológiai megközelítéseket. Ehhez a Spectrozyme-PL (H-D-norleucil-hexahidrotirozil-lizin-p-nitroanilid, American Diagnostica, Hartford, CT) szubsztrátot választottuk, mert erre nézve a plazmin K_M értéke nagyságrendekkel alacsonyabb ($6\ \mu\text{M}$ [XXXIII]) más kromogén szubsztrátokhoz képest (pl. S-2251, azaz H-D-valil-L-leucil-L-lizin-p-nitroanilid esetében a K_M $266\ \mu\text{M}$ [101]). A Spectrozyme-PL e tulajdonsága lehetővé tett olyan kísérleti megközelítést a plazmin (és eltérő kringle-számú származékainak) enzimkinetikai analízisének, amely a Spectrozyme-PL és a fibrinogén vagy fibrin monomer közötti kompetíció alapján számszerűen jellemzi a makromolekuláris szubsztrátok iránti proteázaffinitást látszólagos K_M értékkel [IV]. A Spectrozyme-PL-en mért plazminaktivitás kiválóan alkalmas a gátlóhatások azonosítására [VII,XVII,XIX].

3.3. *Plazminogén aktiváció vizsgálata*

3.3.1. *Plazminogén aktiváció fibrin jelenlétében*

Ahogy a bevezető részben ismertetésre került, a trombolízis során a plazminogén aktivátorok elsősorban a fibrin vékony felszíni rétegében levő plazminogénre fejtik ki hatásukat. Ennek a szituációnak a modellezésére a londoni National Institute for Biological Standards and Control munkatársaival közösen egy új vizsgálati rendszert dolgoztunk ki [101,X]. A módszer lényege, hogy a plazminogén tartalmú fibrint olyan ionerősség mellett készítjük el, hogy annak turbiditása minimális legyen, és felszínére a plazminogén aktivátort a plazmin szubsztráttal (Spectrozyme-PL) együtt rétegezzük rá. Így a keletkező plazmin *p*-nitroanilint (pNA) szabadít fel a szubsztrátból, amelynek abszorbanciáját $405\ \text{nm}$ -nél (A_{405}) folyamatosan mérjük. A plazminogén aktiváció sebességét az A_{405} -nek az idő négyzetével (t^2) szembeni ábrázolásával tudjuk a legegyszerűbben kiértékelni, hiszen telítő plazminogén és plazmin szubsztrát koncentrációknál $A_{405} = 0.5 \cdot \varepsilon \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot [PA] \cdot t^2$ [102], ahol ε a pNA extinkciós együtthatója, k_1 a plazmin katalitikus állandója szubsztrátján, a $k_2 \cdot [PA]$ pedig a plazminogén aktiváció sebessége (k_2 a plazminogén aktivátor katalitikus állandója, $[PA]$ a plazminogén aktivátor koncentrációja). A módszer előnye, hogy hűen modellezi az *in vivo* trombolízis körülményeit és kiküszöböli a fibrin turbiditásán alapuló mérés kis érzékenységét (a vékony rétegben történő turbiditásváltozás helyett a fibrinhez képest nagy moláris feleslegben levő plazmin szubsztrátból történő magas extinkciós együtthatójú pNA-t

detektálja). A módszer segítségével el lehet különíteni a fibrin tulajdonságait mint a plazminogén aktiváció kofaktora (amelyre érzékeny a módszer) és mint a plazmin szubsztrátja (amely nem befolyásolja a rendszert). Így sikerrel lehet azonosítani fibrin környezetben érvényesülő plazminogén aktivációt moduláló tényezőket [X,XVII].

3.3.2. Plazminogén aktiváció homogén rendszerekben

A plazminogént különböző kofaktorok jelenlétében tPA-val aktiváltuk és az aktiváció alatt több időpontban mintát vettünk ki a homogén aktivációs elegyből, amelyben meghatároztuk a keletkezett plazmin mennyiségét vagy Spectrozyme-PL-en mért aktivitás alapján vagy redukció után végzett gélelektroforézissel a plazmin két láncának megjelenése alapján [I,V,VI,X,XV,XVII]. Ezekben a kétfázisú vizsgálati rendszerekben kiküszöböljük a lizin tartalmú plazmin szubsztrátok hatását a plazminogén aktivációra [XXXIII].

3.4. Intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálata

3.4.1. Jelölt fehérjék felhasználásán alapuló módszerek

A hagyományos radioaktív jelölés mellett (^{125}I) [103] Eu^{3+} -keláttal ($\text{Eu}^{3+}\text{-N}^1\text{-(p-izotiocianátobenzil)-dietiléntriamin-N}^1,\text{N}^2,\text{N}^3,\text{N}^4\text{-tetraecetsav}$) is jelöltük a vizsgált fehérjét [104]. Az utóbbi jelölés nagy előnye, hogy egyszerűbben (az izotóp sugárzásvédelmi előírások mellőzésével) alkalmazható és ugyanakkor érzékenysége megegyezik a radioaktív jelölésével, amely felől nemcsak irodalmi adatok [104], hanem saját összehasonlító vizsgálataink alapján is megbizonyosodhattunk [IX]. Ennek alapja, hogy az Eu fluoreszcenciája lassan cseng le, így 400 μs -al az excitáció után is mérhető, amikor a nem-specifikus fluoreszcencia teljesen lecseng, ráadásul a nagy (300 nm) különbség az excitációs és emissziós maximum között is hozzájárul az alacsony háttérszignálhoz.

A kötődési vizsgálatokhoz a klasszikus megközelítést alkalmaztuk: szilárd felszínhez immobilizáltuk az egyik vizsgált molekulát (R) és erre különböző koncentrációkban rétegeztük a másik ligandot (L , állandó mennyiségű jelölt és növekvő mennyiségű jelöletlen formája) [IX]. Az egyensúly beálltával a folyadékfázist eltávolítottuk és a felszínhez kötődött jelölt fehérjemennyiséget mértük. Újdonságot jelent az általunk bevezetett analitikai eljárás. Az egyensúlyi disszociációs állandó (K_d) meghatározásához használt egyenletben $L_{\text{kötött}} = k_{NS} \cdot [L]_{\text{szabad}} + R \cdot \frac{[L]_{\text{szabad}}}{K_d + [L]_{\text{szabad}}}$ [105], amely a nem-telíthető (nem specifikus) kötődést is figyelembe veszi a k_{NS} állandóval, a nem-kötött (szabad) L látszólag független változóként szerepel, pedig tulajdonképpen számolással

nyerjük a mért $L_{kötött}$ felhasználásával a $L_{kötött} + V \cdot [L]_{szabad} = V \cdot [L]_{össz}$ alapján (ahol V a térfogat, amelyben alkalmazzuk a ligandot). A klasszikus regresszióanalízis szerint azonban a független változó nem tartalmazhat kísérleti hibát, így ezt nem alkalmazhatjuk az L_{szabad} tekintetében, az irodalomban található ajánlásokkal ($L_{kötött}$ és $L_{össz}$ értékeit illeszteni az L_{szabad} -hoz) [106] pedig nem sikerült elfogadható értékre csökkenteni az $L_{össz}$ -re vonatkozó hibát. Emiatt olyan matematikai eljárást vezettünk be, amely egységes rendszerként kezeli a fenti két egyenletet a paraméterek illesztése során, az $L_{össz}$ pedig tényleges független változóként szerepel [IX]. Ráadásul ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy a mért $L_{kötött}$ kísérleti szórása alapján Monte Carlo szimulációval [107,XIX,XXVI] szintetikus paramétereket nyerjünk és meghatározzuk valószínűségi eloszlásukat, amely a valódi kísérleti hibát tükrözi.

3.4.2. Surface plasmon resonance (SPR)

A módszer alkalmazásánál az egyik vizsgált molekulát immobilizáljuk a szenzor chip felszínéhez, míg a ligandot áramoltatjuk fölötte. A kötődés miatt változó optikai törésmutató kiváltja az SPR szignált, amely alapján az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat, illetve az egyensúlyi állandókat tudjuk meghatározni [108]. A módszer nagy előnye, hogy nem kell megjelölni (és így kémiaiilag módosítani) a kölcsönhatásban résztvevő molekulákat, és minimális anyag mennyiségekkel lehet nagyszámú mérést végezni. Olyan esetekben azonban, amikor az egyik anyag nem egyes molekulákkal, hanem a molekulák által alkotott aggregátumokkal szerepel a kölcsönhatásban, akkor az immobilizáció során keletkező felszín geometriája is befolyásolja az eredményeket, ahogy az általunk vizsgált egyik interakcióban ez ki is derült [X].

3.4.3. Izoterm titrálási kalorimetria (ITC)

A módszer az intermolekuláris kölcsönhatások során fellépő entalpiaváltozások alapján jellemzi a kötődések erősségét [109,110]. Az ITC kiküszöböli az előző módszer hátrányát, mert alkalmazásához nem szükséges immobilizálni molekulákat, és így a több molekulából álló kötőhely tulajdonságait sem befolyásolja a mérés technika. Hátránya viszont, hogy relatíve tömény (tized millimoláris tartományban) oldatokkal nagy (1,5 ml) térfogatban kell elvégezni a méréseket ahhoz, hogy értékelhető hőszignált nyerjünk, és így az anyagfelhasználás limitálja az elvégezhető mérések számát.

3.5. Morfológiai vizsgálatok

3.5.1. Trombusok egyes komponenseinek azonosítása

A miozin jelenlétét sebészileg eltávolított artériás trombusokban immunhisztokémiai és immunofluoreszcens eljárással sikerült kimutatni [IX]. Amennyiben anti-miozin és anti-fibrin primer antitesteket egyszerre alkalmazunk, eltérő fluorofort hordozó másodlagos antitestek segítségével konfokális lézer mikroszkóppal a két antigén trombuson belüli relatív térbeli eloszlásáról is információt lehet nyerni. A módszer hátránya, hogy nem teszi lehetővé az antigének mennyiségi meghatározását.

A trombusok foszfolipid tartalmát differenciált Nílus-kék festéssel mutattuk ki [111,X]. Változó mennyiségű szintetikus foszfolipidet tartalmazó fibrinnel összehasonlítva, a festés lehetővé teszi a trombus foszfolipid tartalmának megközelítő becslését.

A trombusok szabad zsírsav tartalmát specifikus fluoreszcens próbával (ADIFAB, akrilodannal jelölt intesztinális zsírsavkötő fehérje) vizsgáltuk, amelynek a 450 nm körüli emissziós maximuma (390 nm-en történő excitáció után) eltűnik, amennyiben ekvimoláris komplexet képez szabad zsírsavval [112,XVII]. Az ADIFAB ismert koncentrációjú zsírsavval történt titrálása után kvantitatív adatokat is biztosít a vizsgált minta szabad zsírsav tartalmáról.

3.5.2. Fibrin fázishatár-rétegének vizsgálata

Fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelölt tPA-t vagy plazmin(ogén)-t fibrin felszínére rétegezve, konfokális lézer mikroszkóppal a jelölt fehérjék alvadékon belüli térbeli eloszlását lehet nyomon követni [X]. Ha pedig Eu-jelölt fehérjéket használunk, az Eu-fluoreszcencia alapján a fibrinbe kerülő fehérje mennyiségét tudjuk meghatározni [XVIII]. A két módszer kombinációjával lehetőség nyílik a határrétegben levő enzimek koncentrációjának becslésére [X].

3.6. Statisztikai értékelés

Munkánk során arra törekedtünk, hogy amennyiben enzimaktivitást vagy intermolekuláris kölcsönhatást valamilyen matematikai modellen keresztül néhány számszerű paraméterrel jellemeztünk, nemcsak a modell szerint legjobb illesztést adó paraméterértékeket adjuk meg, hanem ezek statisztikai variabilitását is (pl. mint a legjobb becsült érték 95 %-os konfidencia tartománya). Mivel még egyszerűbb modellek esetén is csak bonyolult analitikai súlyzó számításokkal lehet a közvetlenül mért adatok szórását konvertálni paraméter-szórássá, e törekvésünk univerzális (modell-független) eszközeként a már említett Monte Carlo szimulációt [107] vagy az ún. „bootstrap” variánsát [113]

alkalmaztuk [IX,X,XVII,XIX]. Ezen eljárások elve, hogy a kísérletben mért adatok átlaga és szórása által definiált normális eloszlású halmazból a számítógép véletlenszerűen annyi adatot vesz ki, ahány mérés történt a valódi kísérletben, és ezekkel elvégzi a modell szerinti paraméter-bebecslést. Amikor 1000 – 1500-szor megismétlődik ez a paraméter-meghatározási ciklus, az így nyert szintetikus paraméterek halmaza elég nagyszámú lesz, hogy ennek középértékét és szórását a valódi paraméterek tükörképének tekintsük, amely magában hordozza a kísérleti hibát. Tulajdonképpen a számítógép azt teszi, amit egy megszállott kutató tenne, ha elegendő idővel és anyagi támogatással rendelkezne: végtelenül sok kísérletet végez az abszolút igazság megközelítéséhez. Egyes esetekben azonban a modell bonyolultsága miatt akár egy paraméter-illesztési ciklus is túl hosszú számítógép-időt vesz igénybe és így még virtuális kísérlet esetén sem végezhető el 1000 – 1500 ismétlés. Ez az oka annak, hogy a sok-paraméteres modelleknél [II,XVI] megelégszünk a legjobb bebecsléssel és nem közlünk statisztikai variabilitást a paraméterekre nézve.

A közvetlenül mért adatok értékelésénél klasszikus statisztikai eljárásokat alkalmaztunk (Pearson-r meghatározást a korrelációk jellemzésére, egyszempontos és kétszempontos varianciaanalízist a különböző változók vagy hatások csoportjai közti különbségek tesztelésére) a STATISTICA 6.0 szoftver (StatSoft, Tulsa, Okla., USA) segítségével. A szignifikanciaszintet legalább $p < 0,05$ értéként határoztuk meg.

4. Eredmények és azok megbeszélése

4.1. Proteázok hatékonysága fibrinfelszín emésztésében

Az ún. „intrinsic” fibrinolízis [114] körülményei között, amikor a fibrint bontó proteáz egyenletesen oszlik el a fibrin alvadékon belül, sikerrel lehet alkalmazni a klasszikus enzimkinetikai megközelítést az enzim szubsztrát iránti affinitásának jellemzésére Michaelis állandóval (K_M), illetve katalitikus hatékonyságának jellemzésére k_{cat}/K_M aránnyal [XXXIV]. Ezzel szemben az *in vivo* trombolízis során a plazmin a fibringél vékony felszíni rétegében keletkezik plazminogénből és diffúziója az alvadék belseje felé erősen korlátozott. Szubsztrátját a folyadékfázisból megközelítő plazmin két különböző kötőhellyel találkozik a fázishatár rétegben. Egyfelől a hasításra érzékeny peptid kötések támadja meg az aktív centrumával, másfelől kringle doménje révén olyan helyekhez is kötődik a fibrinen, amelyek közvetlenül nem eredményeznek polipeptidlánc-hasítást. Az utóbbi non-produktív kötődések emelik az enzim koncentrációját a határrétegben és ugyanakkor mikrogócokba rendezik a plazmin molekulákat, ami magyarázza azt a jelenséget, hogy a fibrin teljes feloldásakor a polipeptidláncok fele teljesen intakt, míg a hasított α , β és γ láncok 25 %-a azonos fibrin monomerben található [51]. A hasítási események ilyen mintázat szerinti eloszlása nem lehet a plazmin szabad diffúziójának eredménye, feltehetőleg az enzim molekulák koncentrációjában mikrogradiensek jönnek létre mind a fibrin protofibrilek hosszában, mind a fibrinrostok keresztmetszetében. Mivel ezeket a molekuláris szintű eseményeket nem tudjuk nyomon követni, a proteáz hatás jellemzésére olyan matematikai modellt vezettünk be, amely a fibrinoldás kísérletben megfigyelt lefolyását a lehető legegyszerűbb kinetikai egyenletekkel írja le, de paraméterei elfogadhatóan tükrözik a szubsztrát és az enzim szerkezet-funkció kapcsolatát. Ehhez olyan elveket alkalmaztunk, amelyek más heterogén-fázisú enzimatis folyamatoknál (pl. különböző biopolimerek, foszfolipidek hidrolízise) hasznos modellekhez vezettek [115-121]. A fibrin lebontását a következő reakcióséma szerint vizsgáljuk $E_{(\tau)} + F_l \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EF \xrightarrow{k_2} E_{(\tau)} + P_{(\tau)}$, ahol $E_{(\tau)}$ a reaktív rétegben levő enzim molekulák száma egy adott τ időpontban, F_l és EF a fibrin monomerek és enzim-fibrin komplexek száma a reaktív rétegben, $P_{(\tau)}$ pedig az egységnyi felületre jutó lebontott szubsztrát molekulák száma egy adott τ időpontban. Az enzim diffúziójának már említett térbeli akadályai miatt a reakciósebességet leíró egyenletekben a proteáz koncentrációt egy

$$\text{tört értékű } p \text{ hatványkitevővel vesszük figyelembe } \left(\frac{dEF(\tau)}{d\tau} \right)^{form} = k_1 \cdot F_l \left(\frac{E_0 - EF(\tau)}{h_1(\tau)} \right)^p,$$

amely tükrözi a mozgás dimenzióiban történő változásokat. E paraméter magasabb (1-t közelítő) értékei azt tükrözik, hogy egy adott szubsztrát szerkezet mellett az enzim molekulák mozgása (és így reakcióképessége) jobban megközelíti a háromdimenziós térben zajló kinetikát, míg alacsonyabb értékei a fibrinrostokhoz történő kötődés és a rostokon belüli irányított mozgás miatt dimenziócsökkenés következménye. A turbiditási kísérleti adataihoz a [II] mellékletben részletezett módszer szerint illesztjük a modell paramétereit. Az eredményeket az **1. és 2. táblázat** mutatja be, a modell és a kísérlet közötti megfelelést pedig a **4. ábra** szemlélteti.

Mint minden modell a miénk is tartalmaz bizonyos leegyszerűsítéseket. A fibrin oldása, ami a kísérletben mint turbiditás-csökkenés jelentkezik, abból adódik, hogy vízdoldékony termékek válnak le a fibrinrostokról. Feltételezésünk szerint statikus körülmények között e folyamat sebességét a proteolitikus lépések határozzák meg, de azt már nem vesszük figyelembe, hogy hány vagy melyik peptidkötést kell hasítani egy-egy termék leválasztásához. Emiatt a paraméterek látszólagosak (így pl. a k_2 nem egy konkrét hidrolitikus reakció sebességi állandója, hanem az oldásra jellemző globális integrált paraméter), ami azzal az előnnyel jár, hogy segítségükkel eltérő proteázok hatékonyságát lehet összevetni a fibrin oldás szempontjából, függetlenül attól, hogy a szolubilizációhoz esetleg eltérő számú és lokalizációjú peptid kötések bontanak. A modell helyességét viszont alátámasztja, hogy ha az egyszerűsítések figyelembevételével összevetjük eredményeinket más megközelítéssel nyert adatokkal. Így pl. 3 g/l fibrinre, amely 100 mM NaCl és 5 mM CaCl₂ mellett polimerizálódott, a plazmin k_2 értéke 5 s⁻¹ [122], amennyiben az értékelésben 10-s szolubilizációs faktort (1 oldott fibrin monomerre eső hidrolizált peptidkötések száma) használnak. Ugyanezzel a feltételezéssel és eltekintve az enzim felszíni felhalmozódásától, azonos körülmények között (ld. a később bemutatott ábrát) a mi modellünk is hasonló értéket ad (5,6 s⁻¹).

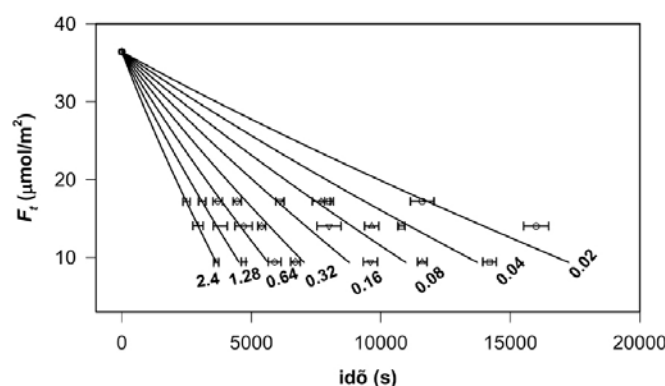
1. táblázat: Nem-kereszt kötött fibrin felszíni emésztésére vonatkozó kinetikai paraméterek.

Az értékek 75 mM NaCl mellett polimerizált fibrinre vonatkoznak a [II] melléklet modellje szerint.

Enzim	k_2 $\times 10^2$ s ⁻¹	$K_1' = k_1 \cdot F_1$ m ^{3p-2} ·nmol ^{1-p} ·s ⁻¹	k_{-1} s ⁻¹	$k_2 \cdot K_1' / (k_2 + k_{-1})$ $\times 10^2$ m ^{3p-2} ·nmol ^{1-p} ·s ⁻¹	p	a függvény relatív négyzet hibája (%)
plazmin	3.87	86.4	57.6	5.80	0.34	9.8
mini plazmin	3.93	83.9	81.8	4.03	0.32	8.7
mikro plazmin	0.81	44.8	19.7	1.84	0.31	15.2
PMN-elasztáz	0.58	83.0	55.7	0.86	0.27	5.3
tripszin	3.62	93.2	96.7	2.88	0.43	23.2

2. táblázat: Keresztkötött fibrin felszíni emésztésére vonatkozó kinetikai paraméterek.
Az értékek 75 mM NaCl mellett polimerizált fibrinre vonatkoznak a [II] melléklet modellje szerint.

Enzim	k_2 $\times 10^2$ s^{-1}	$K_I' = k_1 \cdot F_I$ $m^{3p-2} \cdot nmol^{1-p} \cdot s^{-1}$	k_{-1} s^{-1}	$k_2 \cdot K_I' / (k_2 + k_{-1})$ $\times 10^2$ $m^{3p-2} \cdot nmol^{1-p} \cdot s^{-1}$	p	a függvény relatív négyzet hibája (%)
plazmin	8.99	16.0	85.9	1.67	0.25	9.3
miniplazmin	16.32	16.9	67.3	4.08	0.22	21.0
mikroplazmin	0.73	24.6	13.7	1.31	0.30	10.0
PMN-elasztáz	0.65	14.9	55.7	0.17	0.41	9.7
tripszin	8.99	16.0	85.9	1.67	0.25	9.3

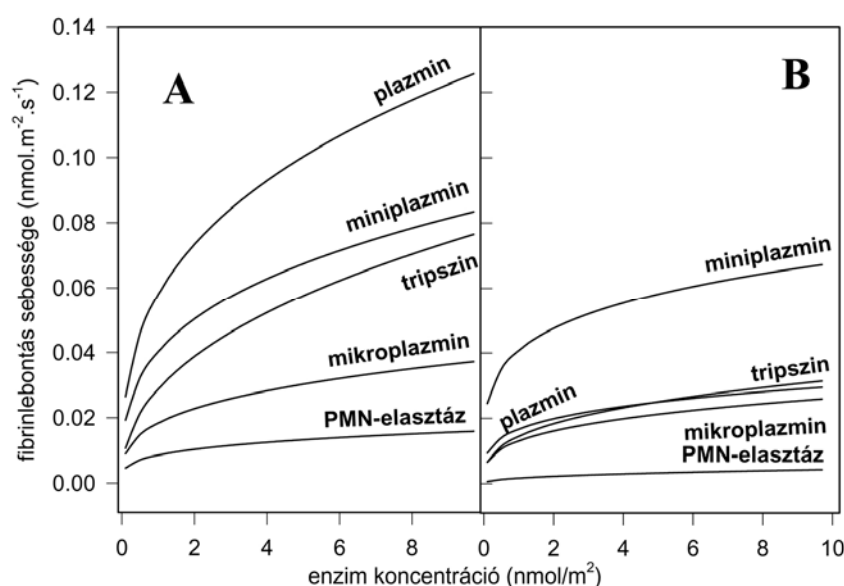


4. ábra: Nem-kereszt-kötött fibrin oldása miniplazminnal. [II]

A fibrin 75 mM NaCl mellett polimerizálódott és felszínére miniplazmin került (a vonalak melletti számok μM -ban jelölik koncentrációját). A 340 nm-nél mért turbiditás alapján meghatároztuk a három fibrinlebontási szint eléréséhez szükséges időt (szimbólumok) és ezekhez az adatokhoz illesztettük a modell szerinti paramétereket (1. és 2. táblázat). A vonalak a modell alapján becsült fibrinbontást ábrázolják.

A fentiekben felvázolt modell segítségével néhány proteáz hatékonyságát jellemeztük a fibrin feloldásában. Mivel a plazmin, miniplazmin és mikroplazmin katalitikus doménje teljesen azonos, a katalitikus paramétereikben tapasztalt különbségek a szerkezetükben szereplő kringle domének eltérő számának tulajdoníthatók (a plazmin 5 kringle domént tartalmaz, a miniplazmin csak egyet, a mikroplazmin pedig csak katalitikus doménből áll). A plazmin és miniplazmin kinetikai paraméterei gyakorlatilag azonosak nem-kereszt-kötött fibrin szubsztráton (**1. táblázat**) a fibrinogénen tapasztaltakhoz hasonlóan [123,124]. Az egyetlen kivétel a k_{-1} , amely jelentősen magasabb értéket mutat miniplazmin esetében (itt érdemes megjegyezni, hogy a mi modellünk nemcsak a k_1/k_{-1} arányra érzékeny mint a homogén fázisú modellek, hanem a két sebességi állandó abszolút értékére is, mivel az enzim vagy enzim-szubsztrát komplex koncentrációi eltérő hatványkitevővel szerepelnek az egyenletekben). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az első négy domén stabilizálja az enzimet az enzim-fibrin komplexben. Ezzel szemben az ötödik kringle feltehetőleg fenntartja a katalitikus domén megfelelően aktív konformációját és hozzájárul a fibrin iránti magasabb affinitáshoz, hiszen a

mikroplazminra, amelyben ez a domén hiányzik, kifejezetten kisebb k_2 és asszociációs állandó jellemző a plazminhoz és miniplazminhoz képest (erre a 4.2. alfejezetben ismertetett eredmények is utalnak). A tripszin, amely a plazminhoz hasonlóan bázikus aminosavak melletti peptidkötéseket hasít, a plazminéval azonos k_2 állandóval rendelkezik, de affinitása a fibrin iránt, amelyet az enzim-fibrin komplex asszociációs és disszociációs állandójának aránya alapján lehet becsülni, kifejezetten alacsonyabb a plazminéhoz, de még a mikroplazminéhoz képest is. Az utóbbi tény arra utal, hogy nemcsak a kringle domének, de a plazmin katalitikus doménének a szerkezete is hozzájárul a plazmin fibrin-specifitáshoz. A PMN-elasztáz, amelynek potenciális *in vivo* szerepére a 4.3. alfejezetben ismertetett eredmények is utalnak, a plazminhoz hasonló fibrin-affinitást mutat, de katalitikus állandója egy nagyságrenddel alacsonyabb. Mivel a sebességegyenletekben a különböző enzimek koncentrációi eltérő p hatványkitevővel szerepelnek, a fibrinemésztésben kifejtett katalitikus hatékonyságukat nem lehet egyetlen arányszám alapján összehasonlítani, ahogy pl. hagyományosan a k_{cat}/K_M arány alapján tesszük homogén fázisú enzimatis reakciókban. Ehelyett a modellparaméterek alapján szimulált reakciósebességeket tudjuk összevetni egy adott enzimkoncentráció mellett (5. ábra).

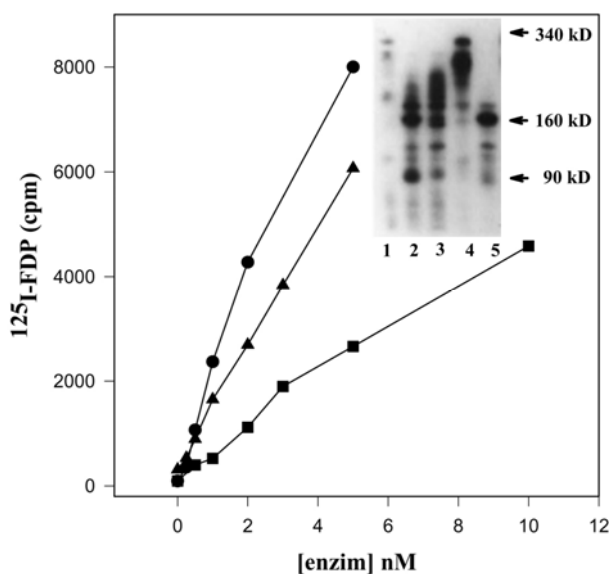


5. ábra: Fibrinoldás becsült sebessége a fibrin felszínére alkalmazott proteázokkal.
[II]

A nem-kereszt kötött (A) és a kereszt kötött (B) fibrin oldási sebességét a [II] mellékletben részletezett modell szerint szimuláltuk az 1., ill. 2. táblázatban szereplő állandók alapján.

A 5. ábra tanúsága szerint nem-kereszt kötött fibrin szubsztráton a vizsgált és fiziológiásan potenciálisan releváns proteázok közül a leghatékonyabb a plazmin, ezt követi a miniplazmin és a PMN-elasztáz. Amennyiben e proteázok aktivitását fibrin

monomereken vizsgáljuk (**6. ábra**), a hatékonysági sorrend megváltozik: ezen a szubsztráton a PMN-elasztáz hatékonysága megközelíti a plazminét és jóval meghaladja a miniplazminét. Az eltérő szubsztrátokon tapasztalt hatékonyságbeli különbségeket azzal lehetne magyarázni, hogy polimerizált fibrin esetében a PMN-elasztáznak több peptidkötést kell hidrolizálnia ahhoz, hogy egy monomer vízdékony termékei leváljanak a mátrixról, vagy azzal, hogy a polimerizált fibrinben más peptidkötések kerülnek hidrolízisre. Az utóbbi lehetőség viszont kevésbé valószínű, ha figyelembe vesszük, hogy a fibrin monomerből PMN-elasztáz hatására keletkező termékek mérete (**6. ábra, betét**) megegyezik a polimerizált fibrinre általunk korábban is közölt méretükkel [XXXIV].

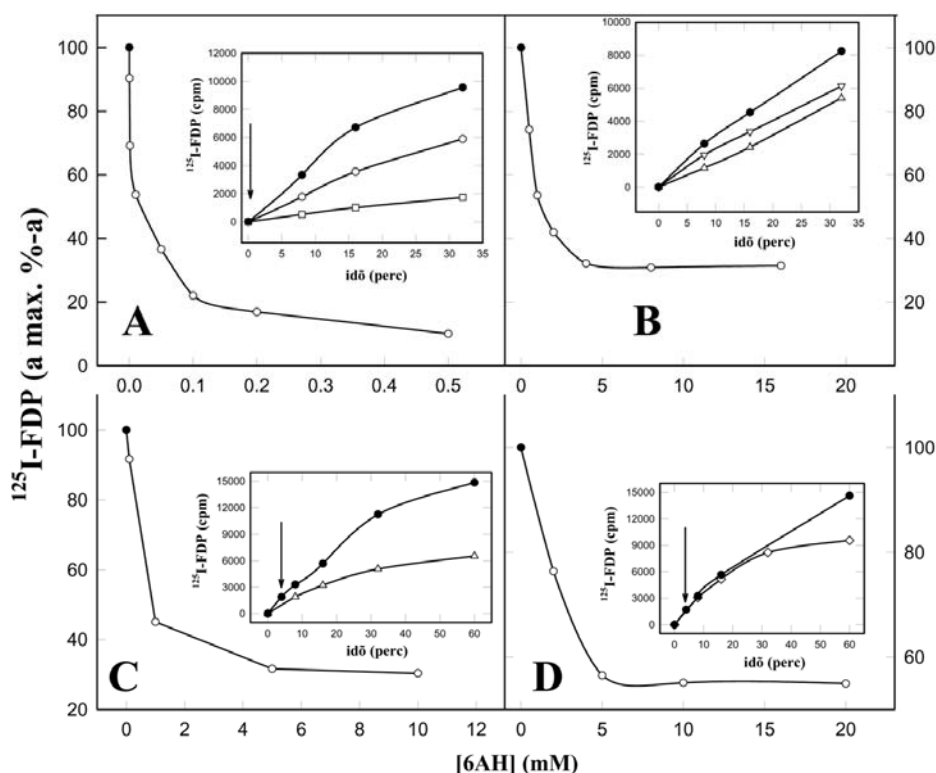


6. ábra: Fibrin monomerek emésztése plazminnal, miniplazminnal és PMN-elasztázzal. [II]

Plazmin (●), miniplazmin (■) vagy PMN-elasztáz (▲) hozzáadása után 8 perccel a ^{125}I -FDP felszabadulását mértük a ^{125}I -fibrin monomerekről. Betétábra: a ^{125}I -fibrin monomerekről 10 g/l BSA (1), 5 nM plazmin (2), 10 nM miniplazmin (3), 5 nM PMN-elasztáz (4) vagy 10 nM miniplazmin és 5 nM PMN-elasztáz (5) által leválasztott ^{125}I -jelölt termékek 7,5 % poliakrilamid gélelektroforézis utáni autóradiográfiás képe.

Kinetikai adataink új elemekkel bővítik a F-XIIIa által keresztkötött fibrin proteolitikus rezisztenciájáról alkotott képet. Meglepő módon plazmin és miniplazmin esetében a keresztkötött fibrinre vonatkozó k_2 értéke 2 – 4-szer magasabb mint a nem-kesztkötött fibrinre vonatkozó érték (**2. táblázat**). Az asszociációs sebességi állandó (K_1') csökkenése azonban magyarázza a keresztkötött fibrin relatív proteolitikus rezisztenciáját. Az izopeptid kötések kialakulása után a fibrin monomerek feltehetőleg olyan konformációt vesznek fel, amely iránt a proteázok affinitása csökken, de az egyes proteolitikus lépések sebessége vagy nem változik (mikroplazmin, PMN-elasztáz, tripszin esetében), vagy nő (plazmin és miniplazmin esetében). A kinetikai paraméterek felhasználásával az egyes

proteázok hatékonyságát keresztkötött fibrinen is össze tudjuk hasonlítani (5. ábra, B). Ezen a szubsztráton a katalitikus hatékonysági sorrend megváltozik a nem-keresztkötött fibrinhez képest: a leghatékonyabbnak a miniplazmin bizonyul (feltehetőleg kisebb molekulamérete kedvezőbb a kompaktabb szerkezetű kovalensen keresztkötött fibrinhálóban), ezt követi a plazmin és a PMN-elasztáz a fiziológiásan releváns proteázok közül. Így bár saját fibrinolitikus aktivitása relatíve alacsony, a PMN-elasztáznak lehet *in vivo* jelentősége azáltal, hogy elősegíti a miniplazmin keletkezését, ami viszont a leghatékonyabb proteáz a keresztkötött fibrin lebontásában.

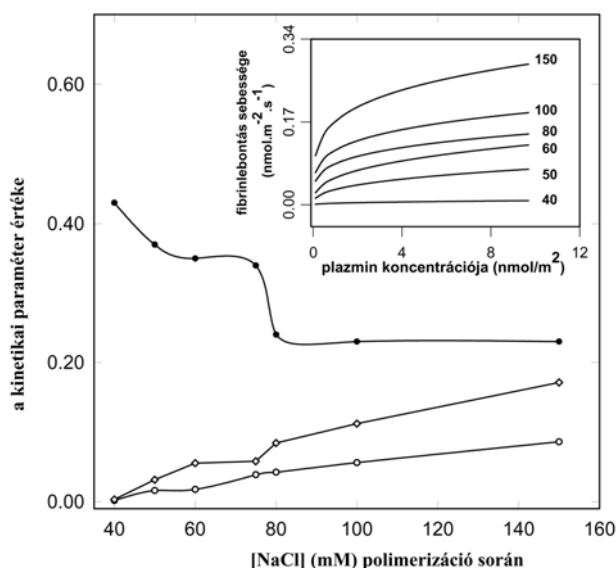


7. ábra: 6-Aminohexanoát hatása fibrin monomerek plazminnal és miniplazminnal történő lebontására. [II]

^{125}I -fibrin monomereket 1 nM plazminnal (A és C), illetve 4 nM miniplazminnal (B és D) kezeltük. A 6AH-t vagy az enzimmel egy időben (A és B) vagy 4 perccel az enzim hozzáadása után (C és D) rétegeztük a fibrin felszínre. A keletkező oldékony termékek radioaktivitását mértük a reakció 16. (A és B), 32. (C) vagy 60. (D) percében. Az eredményeket a 6AH hiányában mért radioaktivitás százalékában fejeztük ki. Betétábrák: fibrinlebontás lefolyása 6AH hiányában (kitöltött szimbólumok) vagy a nyilakkal jelzett időpontban hozzáadott 6AH mellett (üres szimbólumok), a 6AH koncentrációja 10 μM (\circ), 200 μM (\square), 500 μM (∇), 1 mM (Δ), 5 mM (\diamond).

A 6-aminohexanoát (6AH) verseng a fibrin lizin oldalláncaival a plazmin kringle doménjeihez történő kötődésben és így gátolja a fibrin lebontását. Ez a gátlás már mikromoláris 6AH koncentrációknál is érvényesül, amennyiben a 6AH-t előinkubáljuk az enzimmel, míg egy nagyságrenddel magasabb 6AH koncentráció szükséges azonos fokú gátlás eléréséhez, ha a plazmin már odakötődött a fibrinhez és a 6AH-t csak akkor adjuk

hozzá (7. *ábra, A és C*). Ez a koncentráció-függés valamint a gátlás időbeli lefolyása (30 perc szükséges a maximális gátlás eléréséhez a második esetben, 7. *ábra, C-betét*) a plazmin hatás processzivitására utal: ha egyszer a plazmin a szubsztrátjához kötődött nem feltétlenül csak disszociáció után tud egy másik hasítandó peptidkötéshez eljutni, hanem lizinhez kötött kringle körüli elfordulás után az enzim aktív centruma hozzáférhet egy másik célponthoz is (erre a kúszási mechanizmusra később visszatérnek további kísérleti eredmények ismertetése után) és így kevesebb plazmin molekula van kitéve a folyadékfázisban levő 6AH hatásának. A miniplazmin egyetlen lizin kötőhelyének blokkolása 6AH-val kevésbé befolyásolja az enzim fibrinolitikus aktivitását a plazminhoz képest (7. *ábra, B*) és 60 perc szükséges a maximális gátláshoz, ha a miniplazmin már kötődött a fibrinhez (7. *ábra, D-betét*). A 6AH hatásai a miniplazmin aktivitására hangsúlyozzák az 5. kringle szerepét az enzim processzivitásában.

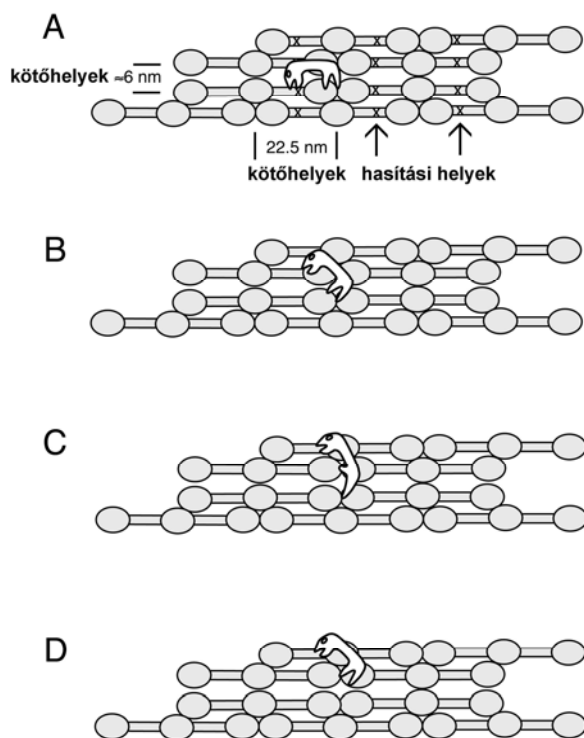


8. *ábra*: Különböző Cl⁻ koncentráció mellett polimerizált fibrin szerkezetének hatása a kinetika paraméterekre, amelyek jellemzik a plazmin általi felszíni fibrinbontást.

A [II] melléklet modellje szerint meghatározott kinetika paraméterek közül az enzim koncentráció hatványkitevője p (●), a katalitikus állandó $k_2 \text{ s}^{-1}$ (○) és a katalitikus hatékonyságra jellemző $k_2 \cdot K_1 / (k_2 + k_{-1}) \text{ m}^{3p-2} \cdot \text{nmol}^{1-p} \cdot \text{s}^{-1}$ arány (◇) került ábrázolásra. Betétábra: plazmin hatására történő fibrinoldás szimulált sebessége eltérő ionerősség mellett polimerizált fibrin esetén (a görbék végén levő szám mM-ban jelöli a NaCl koncentrációt, amely mellett polimerizálódott a fibrin).

Amennyiben a fibrinogén – fibrin átalakulás különböző Cl⁻ koncentráció mellett történik, eltérő rostvastagságú és pórusméretű fibrin háló jön létre [125]. Azonos trombin és fibrinogén koncentráció, de emelkedő [Cl⁻] mellett egyre vékonyabb szálú, sűrűbben elágazódó és kisebb pórusú fibrin háló keletkezik. Az ily módon létrehozott fibrinnel modelleztük a különböző alvadékszerkezeteket, amelyek *in vivo* a Bevezetésben részletezett tényezők hatására jönnek létre, és meghatároztuk a plazmin kinetika

paramétereit ezeken a szubsztrátokon (**8. ábra**). A $[Cl^-]$ emelkedésével a plazmin látszólagos k_2 állandója nő, míg az enzimkoncentráció p hatványkitevője csökken. A k_2 értékének változását úgy lehetne értelmezni, hogy a plazminnak kevesebb peptidkötést kell hasítania a vékonyabb fibrin szálakon ahhoz, hogy a degradációs termékek leváljanak a hálóról (tehát még egy peptidkötésre vetített azonos sebességi állandó esetén is az oldás szempontjából magasabb k_2 értéket állapítunk meg). Másfelől a vastagabb rostok esetében a tömegre vonatkoztatott kisebb fajlagos szálfelület és a nagyobb pórusméret miatt a plazmin molekulák mozgási szabadságfoka nagyobb, és így az enzimkoncentráció magasabb p hatványkitevővel szerepel a kinetikai egyenletekben alacsony $[Cl^-]$ mellett képzett fibrin szubsztráton (**8. ábra**). Egy adott enzimkoncentráció mellett a $k_2 \cdot K'_1 / (k_2 + k_{-1})$ arány jól tükrözi a plazmin hatékonyságát eltérő fibrin szubsztrátok oldásában és a **8. ábra** tanúsága szerint ez a hatékonysági mutató követi a k_2 tendenciáját és ennek alapján kimondható, hogy a plazmin hatékonyabb vékonyabb szálú, sűrűbben elágazódó fibrin szubsztráton. A p kitevő tört értéke miatt eltérő plazmin koncentrációknál ezt is figyelembe kell venni és így csak szimulált fibrinoldási sebesség alapján tudjuk a katalitikus hatékonyságot összevetni, de ilyen értékelés is alátámasztja az előző következtetést (**8. ábra, betét**). A kinetikai adatok alapján tett következtetéseink szerkezeti vizsgálatokat inspiráltak [126,127], amelyek pásztázó elektron, ill. konfokális lézer mikroszkópiával egyértelműen kimutatták, hogy a fibrinolízis során plazmin hatására először a vékony fibrinrostok tűnnek el és csak később a vastagabb szálak. A szerkezeti adatok azt is igazolták, hogy a fibrinrostok emésztése nem rétegről rétegre történik, hanem a plazmin keresztbe metszi ezeket (egy magasságban több egymás mellett levő monomert hasít), ami utólag alátámasztotta az általunk a kinetika alapján felvetett plazmin processzivitást [128]. Annak köszönhetően, hogy a plazmin molekula több kringle doménen keresztül képes a részlegesen degradált fibrinben lizin oldalláncokhoz kötődni és e támpontok körül elfordulni, az enzim aktív centruma könnyen elérheti az egymástól a rostban belül 5-10 nm-es távolságra fekvő monomerek érzékeny peptid kötéseit, mint a rost hosszában legalább 22,5 nm-es távolságra levő legközelebbi hasítható kötést, ahova csak disszociáció és új asszociáció útján juthat el (**9. ábra**) [129]. Kinetikai modellünk hangsúlyozza a fibrin szerkezetének jelentőségét a trombusok litikus érzékenységeiben és segíti bizonyos fiziológiás és patológias jelenségek értelmezését. Így pl. ismert, hogy aktivált protein C (a protrombin aktiváció negatív regulátora) jelenlétében keletkező fibrin átlagos rostátmérője kisebb [130], így a mi eredményeink fényében érthető a protein C pro-fibrinolitikus hatása is (a plazmin nagyobb hatékonysággal oldja a finomabb fibrin hálót).



9. ábra: A „csúszó-mászó” plazmin a fibrinhálóban.

A háromcsomós pálcikák a fibrin monomereket ábrázolják, amelyek egymáshoz kötődnek a rostokban. A plazmin az élőlény, amelynek harapó feje a katalitikus domén, lábai pedig a kringle doméneken lokalizálódó fibrin kötőhelyek. A kritikus hasítási helyeket nyilak jelzik. A plazmin konformációváltozásai lehetővé teszik a processzív hatásmechanizmust. A) A plazmin kötőhelyei a fibrin monomerek találkozási pontjainál, ill. központi doménjeiben találhatók, azaz 22,5 nm-es távolságra egymástól a rost hossza mentén, de csak 6 nm-re keresztmetszetben. B) A plazmin elfordul az egyik kötőhely körül.

C) Konformációváltozás lehetővé teszi a plazmin kötődését egy másik kötőhelyhez is. D) Egy új konformációváltozás helyreállítja a plazmin eredeti állapotát, ami lehetővé teszi egy másik monomer hasítását ugyanabban a keresztmetszetben ([129] nyomán, módosítva).

4.2. Kringle domének funkcionális jelentősége a plazmin aktivitásában fibrinogénen és fibrinen

A plazmin, miniplazmin és mikrop plazmin fibrin felszínen kifejtett hatásaiban jelentős eltérések tapasztalhatók, ahogy az az előző fejezetben ismertetésre került. E három proteáz jól körülírt szerkezeti különbségeik és azonos proteáz doménjük miatt kiválóan alkalmazhatók modell molekulákként a szerkezet-funkció kapcsolatok tanulmányozásában.

A fibrinogén és fibrin iránti proteáz affinitást korábban bevezetett kompetíción alapuló módszerünkkel értékeltük [XXXIV]. E szerint a proteáz egyszerre két szubsztrátra hat (Spectrozyme-PL és fibrinogén vagy fibrin) és a Spectrozyme-PL lebontási sebessége

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{S + K_M^{SS} \left(1 + \frac{Fg}{K_M^{Fg}} \right)}$$

kinetikai paraméterektől (K_M^{SS} és V_{\max}) függ, hanem a kompetáló fehérje koncentrációjától (Fg) és Michaelis állandójától (K_M^{Fg}). Méréseink során megbizonyosodtunk, hogy emelkedő fibrinogén vagy fibrin koncentráció mellett a proteázra jellemző maximális reakciósebesség (V_{\max}) nem változik, csak a Spectrozyme-PL-re vonatkozó látszólagos

Michaelis állandó emelkedik, ami megfelel a fenti egyenlettel leírt kompetíciónak. Az így meghatározott K_M^{Fg} értékeket a **3. táblázat** foglalja össze. A K_M alapján fibrinogén iránt a plazmin affinitása a legnagyobb, míg a miniplazmin és mikroplazmin K_M értékei között nincs szignifikáns különbség. A vizsgált proteázok közül 2 mM 6AH csak a plazmin K_M értékét változtatja meg úgy, hogy az a mini- és mikroplazminéhoz hasonlóvá válik. Ezek az adatok az 1.-4. kringle domének szerepére utalnak a plazmin-fibrinogén komplex kialakulásában. Egy fibrinogén molekula négy plazminogént tud kötni és minden egyes plazminogén csatlakozása után a következő plazminogén egyre nagyobb affinitással kötődik [131]. Ez a pozitív kooperativitás érvényesülhet plazmin esetében is és feltehetőleg az 1.-4. kringle domén jelenlététől függ, ami az alacsonyabb K_M értékben nyilvánul a miniplazminhoz képest. Az összes vizsgált proteáz fibrinre vonatkozó K_M értéke egy nagyságrenddel alacsonyabb mint fibrinogén szubsztráton és ez független a kringle domének jelenlététől. Ugyanakkor a PMN-elasztáz és katepszin G, amelynek katalitikus doménje eltér a plazminétól, magasabb K_M -mel rendelkezik fibrinre nézve (0,4 μ M körüli a korábbi eredményeink szerint [XXXIV]), ami ugyanúgy a proteáz domén jelentőségét támasztja alá a fibrin-enzim komplex kialakulásában, ahogy az előző fejezetben ismertetett fibrin felszínen nyert kinetikai paraméterek alapján is erre konkludáltunk. A rostokba rendezett fibrin monomerek konformációs szabadsága kisebb a fibrinogénhez képest, így a már említett pozitív kooperativitás nem érvényesülhet a kötődésben és a kringle doménektől függetlenül az azonos, vagy hasonló katalitikus doménnel rendelkező proteázok K_M értéke közel egyforma. E mellett a fibrinogén-fibrin átalakulás során a plazmin kötőhelyek konformációja megváltozhat, ami nagyobb affinitást eredményez.

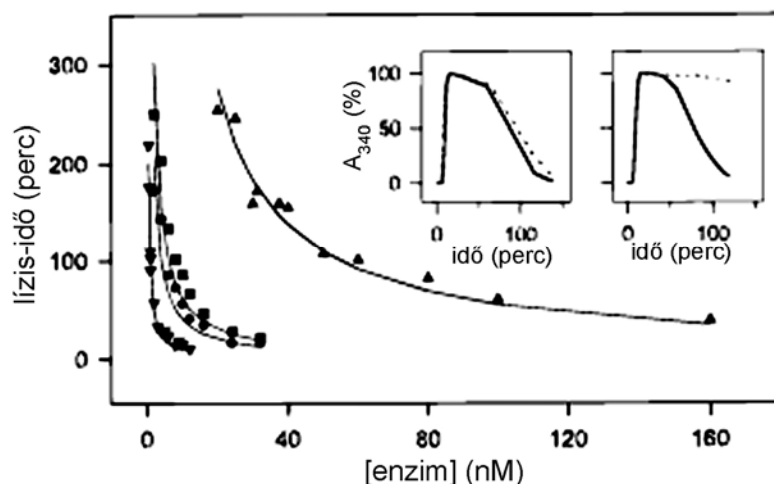
3. táblázat: Fibrinogén és fibrin degradáció kinetikai paraméterei

A [IV] mellékletben meghatározott paraméterek kerültek feltüntetésre. A „ K_M 6AH” 2 mM 6AH mellett mért értékeket jelöl.

	<i>Fibrinogén</i>				<i>Fibrin</i>			
	K_M μ M	K_M 6AH μ M	$k_{cat} \times 10^2$ s^{-1}	k_{cat}/K_M $mM^{-1}s^{-1}$	K_M μ M	K_M 6AH μ M	$k_{cat} \times 10^2$ s^{-1}	k_{cat}/K_M $mM^{-1}s^{-1}$
plazmin	2,0	13,4	25,6	128	0,14	1,26	6,4	460
miniplazmin	8,1	10,3	32,8	40	0,21	0,82	4,8	230
mikroplazmin	11,1	8,5	29,2	26	0,12	0,28	0,76	63
tripszin	3,4	3,4	6,0	18	0,16	0,16	47,2	2950

A fibrin k_{cat} értékének meghatározásához az általunk korábban [XXXIV] bevezetett módszert használtuk, amely során a fibrin oldása során csökkenő turbiditást és egy adott turbiditás szinthez tartozó intakt fibrin mennyiséget mértük. Mivel az összes vizsgált proteáz K_M értéke 0,1 μ M nagyságrendű és a használt fibrin monomer

koncentrációja 6 μM , a reakciók vizsgált szakaszában az enzimek végig telítve vannak szubsztráttal. Így egy adott fibrin szint (Fn_e) eléréséhez eltelt idő (t_e) és az enzimkoncentráció (E) között a következő összefüggés áll fenn $t_e = \frac{Fn_0 - Fn_e}{k_{cat} \cdot E}$. A meghatározáshoz felhasznált adatokat a **10. ábra** mutatja be.



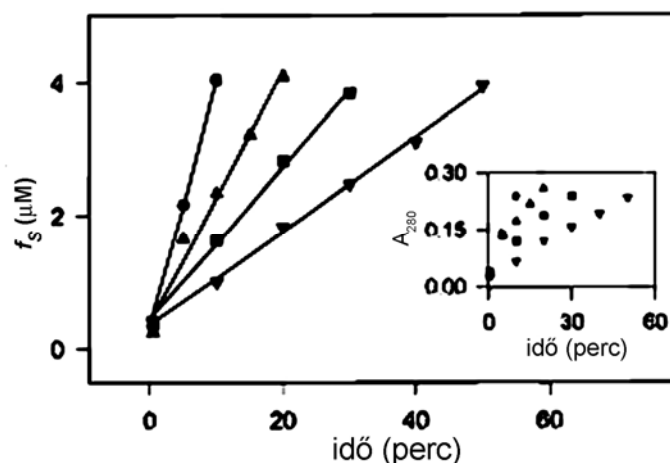
10. ábra: Fibrinoldás katalitikus állandójának meghatározása turbidimetria alapján. [IV]

A vizsgált proteáz (●, plazmin; ■, miniplazmin; ▲, mikroplazmin; ▼, tripszin) a trombinnal együtt került be a fibrinogén oldatba és így a fibrin keletkezése előtt egyenletesen eloszlott a feltüntetett végkoncentrációkban. A betétábrákon bemutatott A_{340} görbék alapján regisztráltuk a maximális abszorbancia felezéséhez szükséges lízis-időt (szimbólumok) és ezekhez az adatokhoz illesztettük a

$$t_e = \frac{Fn_0 - Fn_e}{k_{cat} \cdot E} \text{ egyenlet alapján a } k_{cat} \text{ értékét (a legjobb illesztést a görbék prezentálják).}$$

Betétábrák: a fibrin keletkezése és feloldása során fellépő turbiditás változások 60 nM mikroplazmin (bal) vagy 8 nM plazmin (jobb) hatására. A szaggatott vonalak 2 mM 6AH mellett végzett méréseket mutatnak be.

Fibrinogén esetében a k_{cat} meghatározásához alkalmasnak bizonyult a Módszerek fejezetben felvázolt eljárás, amely etanolos kicsapás után az oldatban maradó peptid termékeket detektálja [IV]. Mivel kezdeti reakciósebességet nem tudtunk megbízhatóan mérni, az eredmények értékeléséhez a Michaelis-Menten egyenlet integrált formáját használtuk $f_s = S_0 - S - K_M^{Fg} \ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$, ahol $f_s = k_{cat} \cdot E \cdot t$ (E , enzim koncentráció; S_0 , kezdeti fibrinogén koncentráció; S , adott időpontban mért etanol-szolubilis termékek levonása után fennmaradó fibrinogén koncentráció). Egy reprezentatív meghatározást a **11. ábra** mutat be.



11. ábra: Fibrinogén emésztés katalitikus állandójának meghatározása etanol-szolubilis termékek keletkezése alapján. [IV]

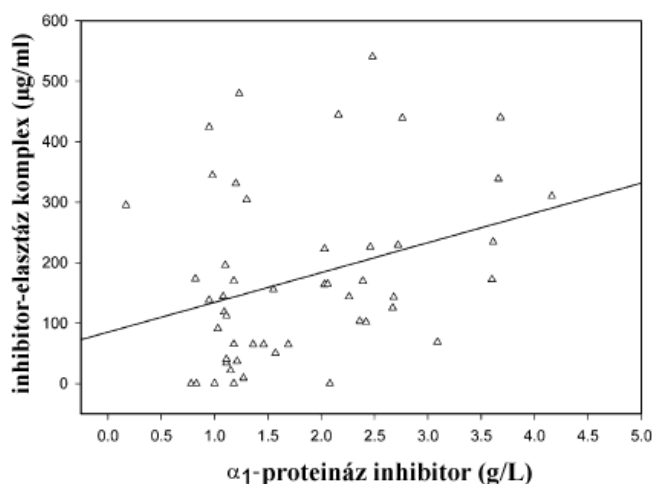
A fibrinogént 5 (▼), 10 (■), 15 (▲) vagy 20 (●) nM plazminnal emésztettük és a feltüntetett időpontokban etanolos kicsapás után mértük a felülúszó abszorbanciáját 280 nm-nél (betétábra). Az adatok alapján kiszámoltuk a fentiekben ismertetett f_s függvény értékét és a $f_s = k_{cat} \cdot E \cdot t$ egyenlethez illesztettük a k_{cat} értékét.

Az így nyert k_{cat} értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy a meghatározás elvéből kifolyólag, az állandó nem egy konkrét kötés hidrolízisének sebességét jellemzi, hanem fibrinogén esetében a kisebb méretű, alvadékot nem képező termékek keletkezését, fibrin esetében pedig a vízoldékony termékek leválását. Tehát mindkét szubsztráton az emésztés globális folyamatának jellemzője és pontosan ezért lehet a k_{cat}/K_M arányt használni a különböző proteázok katalitikus hatékonyságának összehasonlítására. A fibrinogénen és fibrinen meghatározott hatékonyság alapján (3. táblázat) azt a következtetést lehet levonni, hogy mind a négy vizsgált proteáz hatékonyabb a fibrin feloldásában mint a fibrin prekursorának eliminációjában. Az azonos katalitikus, de eltérő számú kringle doménnel rendelkező proteázoknál a k_{cat}/K_M arány csökken a kringle domének elvesztésekor. Különösen feltűnő a fibrinoldásban meghatározott katalitikus állandó 6-szoros különbsége mini- és mikrop plazmin között, amikor az 5. kringle is eltávolításra kerül. Ez a tény alátámasztja az 5. kringle szerepét a katalitikus domén funkcionális konformációjának fenntartásában, ahogy az a fibrin felszíni emésztésében mért kinetikai paraméterek [II] kapcsán már felvetődött. A katalitikus hatékonyság-csökkenés hátterében még az előző fejezetben tárgyalt processzivitás is állhat: a kringle domének elvesztésével a plazmin származékok már nem hidalhatják át a szomszédos monomerek közötti távolságot, és így csak disszociáció-diffúzió-asszociáció útján juthatnak el új hasítandó peptidkötésekhez. Rekombináns plazmin származékokkal vizsgált fibrinoldás során [132] olyan különbségek jelentkeznek a mini- és mikrop plazmin között,

amelyek teljes összhangban állnak az általunk meghatározott kinetikai paraméterek alapján becsült katalitikus hatékonysággal.

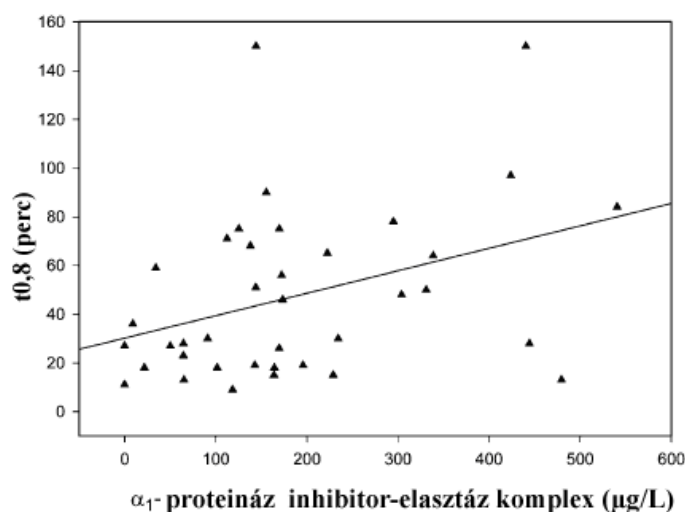
4.3. PMN-elasztáz *in vivo* hatásának következményei a vérplazma fibrinolitikus potenciáljának tekintetében

Mivel az előzőekben ismertetett heterogén és homogén fázisú fibrinolitikus modellekben szignifikáns különbségek jelentkeztek a plazmin és miniplazmin hatékonyságában, továbbá a Bevezetésben említett módon a miniplazminogén könnyebben aktiválható, felmerül a kérdés, hogy mennyire valószínű a plazmin(ogén) átalakulása miniplazmin(ogén)-né *in vivo*. Ehhez indirekt támpont lehet a PMN-elasztáz *in vivo* működésére vonatkozó információ, mert ez a proteáz alakítja át a plazminogént miniplazminogénné. E kérdés megválaszolásához 56 olyan beteg fibrinolitikus potenciálját vizsgáltuk, akik tüdő embóliát szenvedtek el, tehát egy olyan állapotban voltak, amelyben a fibrinolitikus rendszer már aktiválódott *in vivo* (kivétel nélkül a plazma FDP szintje emelkedett volt, a betegcsoport további részletei a [XI] mellékletben megtalálhatók). A vérplazma fibrinolitikus potenciáljának megítéléséhez a rekalcifikált plazmát trombinnal megalvasztottuk és a tPA, vagy plazmin hatására beinduló fibrinoldást turbiditás alapján követtük. A turbiditás egy tetszőlegesen választott fokú csökkenéséhez szükséges lízis-idő információt hordoz a komplex fibrinolitikus folyamat összes plazmarésztvevőiről (plazminogén vagy miniplazminogén, PAI, α_2 -PI, fibrinogén), ha tPA-val indítjuk az oldást, és csak az utóbbi kettőről (α_2 -PI, fibrinogén), ha plazminnal. A PMN-elasztáz *in vivo* kifejtett hatására a plazmában mért PMN-elasztáz- α_1 -PI komplex alapján következtettünk. Mivel az α_1 -PI nagy ($\geq 40 \mu\text{M}$) koncentrációban van jelen a plazmában és magas ($8,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) másodrendű sebességi állandóval megköti a szabad fázisban (működési kompartmentjén kívül) levő PMN-elasztázt [XXX], az enzim-inhibitor komplex jelenléte jelzi, hogy a szervezeten belül a proteáz működésbe lépett, koncentrációja pedig pszeudo-elsőrendű körülmények között egyenesen arányos a felszabadult PMN-elasztáz mennyiségével. Ugyanakkor, ahogyan a **12. ábra** mutatja, az α_1 -PI plazma szintje és a PMN-elasztáz- α_1 -PI koncentrációja között is létezik korreláció (bár gyenge, de szignifikáns: $r = 0,2987$; $p = 0,037$). Tehát elképzelhető, hogy a magasabb inhibitor koncentrációk még felszabadulása színhelyén is erősen korlátozzák a PMN-elasztáz funkcióját.



12. ábra: Az α_1 -PI és a PMN-elasztáz- α_1 -PI komplex korrelációja. [XI]

Az inhibitor és az enzim-inhibitor komplex koncentrációját a [XI] mellékletben leírtak szerint mértük. Minden „ Δ ” jel egy-egy beteg mért értékeit jelenti, az egyenest az adatok alapján lineáris regresszióval illesztettük.



13. ábra: A plazmák tPA-val indukált fibrinolízisének lízisideje ($t_{0,8}$) és a PMN-elasztáz- α_1 -PI komplex korrelációja. [XI]

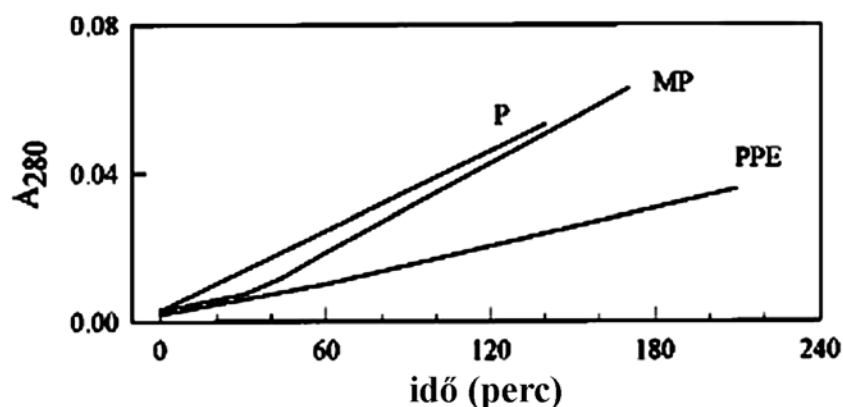
A komplex koncentrációját [XI] mellékletben leírt módon határoztuk meg. A plazmát trombinnal megalvasztottuk és az alvadék turbiditását követtük. A trombinnal együtt alkalmazott tPA indukálta a lízist. A $t_{0,8}$ értékeket úgy számítottuk, mint azt az időtartamot, ami ahhoz szükséges, hogy a maximális turbiditás a 80 %-ára csökkenjen. Minden „ \blacktriangle ” jel egy beteg adatait jelenti, az egyenest lineáris regresszióval illesztettük az adatokra.

A **13. ábrán** bemutatott adatok szerint a plazma alvadék lízis-ideje korrelál a PMN-elasztáz- α_1 -PI koncentrációval ($r = 0.3672$; $p = 0.023$), ha az oldást tPA-val indukáljuk, és nem korrelál ($r = 0.1869$; $p = 0.405$), ha plazminnal indítjuk (nem ábrázolt adatok). Így ha a PMN-elasztáz- α_1 -PI koncentrációt a proteáz és az inhibitor lokális

egyensúlyának indikátoraként kezeljük, ezt az eredményt úgy lehet értelmezni, hogy a kevésbé gátolt lokális PMN-elasztáz (alacsony PMN-elasztáz- α_1 -PI szint) gyorsabb tPA-indukálta fibrinolízishez vezet, de nem hat ki a plazmin-indította fibrinolízisre. Tehát az *in vivo* működő PMN-elasztáz olyan plazma faktort módosított, amely a plazminogén aktivátor és nem a plazmin hatásához kötődik. A PMN-elasztáz ismert plazma szubsztátjai közül a plazminogén lehet az a tényező, amelynek a PMN-elasztázzal történő módosítása magyarázhatja megfigyelésünket. A PMN-elasztáz eltávolítja az 1.-4. kringle doméneket a plazminogénről, a miniplazminogént a tPA gyorsabban aktiválja [92] és a keletkező miniplazmin az előzőekben tárgyalt hatékonysággal (ami egyes esetekben felülmúlja a plazminét) oldja a fibrint. A PMN-elasztáz egyéb potenciális célpontjai (fibrinogén, α_2 -PI) valószínűleg nem szerepelnek a plazma fibrinolitikus potenciáljának leírt változásaiban, mert ezek emésztése a plazmin-indukálta lízist is befolyásolná, amit adataink nem igazolnak.

4.4. Fibrinolízis perfúziós modellben

Az eddig ismertett kísérleti összeállításoknál a fibrin oldását statikus körülmények között vizsgáltuk, amikor az alkalmazott enzimek proteolitikus aktivitása határozza meg az oldás sebességét. *In vivo* azonban a trombolízis keringés alatt zajlik, amikor a nyomási viszonyok befolyásolják az enzimek transzportját a trombusba, illetve a nyíróerők a degradációs termékek leválását a szilárd mátrixról. Ennek megfelelően a potenciálisan releváns proteázok (plazmin, miniplazmin és PMN-elasztáz) fiziológiás szerepének teljesebb értékeléséhez áramlás alatt is vizsgáltuk fibrinre kifejtett hatásukat [III]. Ehhez két modellrendszert alkalmaztunk: az egyikben az előre elkészített henger alakú fibrin (F-XIIIa által keresztkötött vagy nem-keresztkötött, ill. adott esetben vérlemezke tartalmú) hosszanti tengelye mentén képzett üres csatornán keresztül proteázokat áramoltattunk, míg a másikon a proteáz már a fibrin polimerizációja előtt egyenletesen eloszlott az alvadék teljes térfogatában és a központi csatornán proteázmentes puffert áramoltattunk. Mindkét esetben a keringő folyadékfázis fehérje tartalmát követtük nyomon.



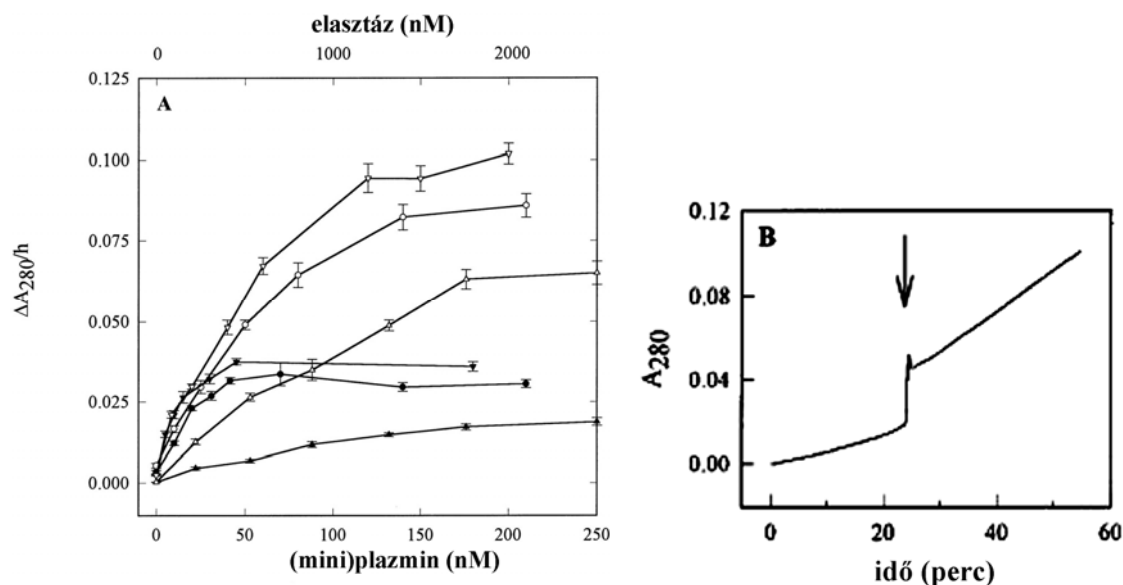
14. ábra: Fibrin oldása keringő proteázok hatására. [III]

Az előkészített fibrin csatornán keresztül 9 nM plazmint (P), 9 nM miniplazmint (MP) vagy 900 nM pankréász elasztázt (PPE) áramoltattunk 25 s^{-1} kezdeti nyírási sebesség mellett és a keringő folyadék abszorbanciáját folyamatosan mértük 280 nm-nél (A_{280}) átfolyó küvettában. $A_{280}=0,32$ megfelel a fibrin 100 %-os feloldásának.

Ha proteáz-mentes puffert keringetünk proteáz-mentes fibrin központi csatornáján keresztül, a folyadékfázis A_{280} értéke nem emelkedik még a rendszerünkben alkalmazható legmagasabb (500 s^{-1}) nyírási sebesség hatására sem, ami megfelel a közepméretű artériákban előforduló viszonyoknak. Tehát az általunk modellként használt fibrin szerkezetek elég ellenállóak a fiziológiásnak tekinthető mechanikai erőkkel szemben. Elasztáz esetében a felszíni cirkulációs kísérletek nagy anyagigénye miatt (megközelítőleg 4 ml térfogatban mikromoláris nagyságrendű enzim koncentráció), amikhez nem tudtunk elegendő mennyiségű PMN-elasztázt biztosítani, hatását pankréász elasztázzal modelleztük. Ez a megközelítés azért indokolt, mert statikus körülmények között a két elasztáz azonos fibrin degradációs termékeket ad és ezek időbeli megjelenése megegyezik SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgálva (nem ábrázolt adatok).

Amikor plazmin vagy pankréász elasztáz kering a fibrin csatornán keresztül, az A_{280} változása idővel lineáris az alkalmazott nyírási sebességtől függetlenül, míg miniplazmin esetében egy kezdeti késleltetés után áll be e proteázra jellemző meredekség (14. ábra). Az abszorbanciagörbe meredeksége csökken 60 – 70 %-os fibrinfogyás után, így a termék felszabadulás kezdeti sebessége ($\Delta A_{280}/h$ vagy emésztett fibrin $\%/h$ mértékegységekben) alkalmas a proteáz hatás jellemzésére (miniplazmin esetében a késleltetés utáni meredekséget vesszük figyelembe). E paraméter alapján eltérő nyírási sebesség mellett a fibrinoldás eltérő módon függ az alkalmazott proteáz koncentrációjától. Alacsony (25 s^{-1}) nyírási sebesség mellett a fibrinoldás sebessége nem emelkedik tovább 30 nM plazmin vagy miniplazmin koncentráció fölött, illetve $1,5\text{ }\mu\text{M}$ elasztáz koncentráció fölött (15. ábra, A). Magas (500 s^{-1}) nyírási sebesség mellett a fibrinoldás 120 nM-ig emelkedő plazmin vagy miniplazmin koncentrációkkal gyorsul, és az így beálló maximális

termék-felszabadulási sebesség ~ 3 -szor magasabb a 25 s^{-1} nyíróerő mellett mért értékhez képest. Az elasztáz hatására történő oldás maximális sebessége is 4-szeres különbséget mutat ebben a nyíróerő-tartományban.



15. ábra: Fibrin oldása változó nyírási sebesség mellett keringő proteázokkal. [III]

A. A fibrin központi csatornáján keresztül plazmin (●,○), miniplazmin (▼,▽) vagy pankréasz elasztáz (▲,△) keringett 25 s^{-1} (kitöltött szimbólumok) vagy 500 s^{-1} (üres szimbólumok) nyírási sebességgel. A fibrinoldási sebességet ($\Delta A_{280}/h$) a **14. ábrán** illusztrált mérési görbék alapján számoltuk ki.

B. A fibrin központi csatornáján keresztül 150 nM plazmin keringett 25 s^{-1} nyírási sebességgel a mérés elején és 500 s^{-1} nyírási sebességgel a nyíllal jelzett időpontot követően. A fibrin degradációs termékeket folyamatosan mértük (A_{280}).

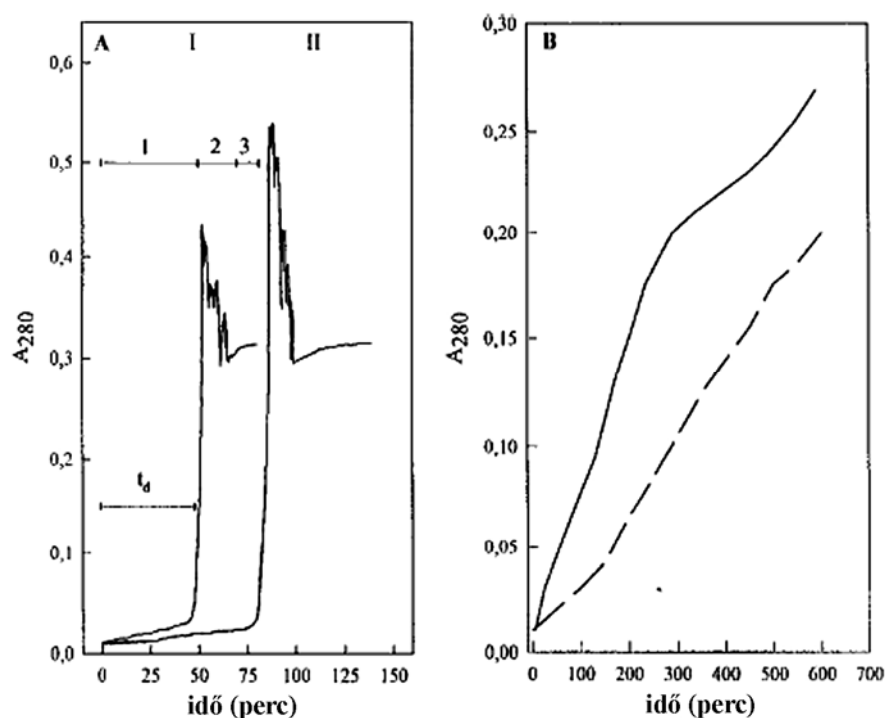
Amennyiben oldás közben növeljük meg az áramlási sebességet (**15. ábra, B**), a változás pillanatában hirtelen nagyobb mennyiségű termék jelenik meg a folyadékfázisban és ezt követően a fibrin oldása a nagyobb nyíróerőnek megfelelően zajlik. Ez az eredmény arra utal, hogy plazmin hatására már a kezdeti fázisban olyan degradációs termékek keletkeztek, amelyeket csak a nagyobb nyíróerők képesek leválasztani a szilárd mátrixról. Tehát ha a proteázok eltérő termékeket eredményeznek (mint pl. a plazmin és elasztáz), áramlás alatt tapasztalt hatékonyságuk attól is függ, hogy a termékek milyen erős kölcsönhatásokat létesítenek a szilárd fázissal. Sőt telítő enzim koncentrációk mellett már nem az enzim proteolitikus hatékonysága határozza meg a fibrinoldás sebességét, hanem a termékek által létesített interakciók. Ezzel lehet magyarázni az áramlás alatt tapasztalt (**4. táblázat**) és a statikus körülmények között megállapított hatékonysági sorrend (**5. ábra**) közötti eltéréseket (így áramlás alatt csak 50 %-os a különbség a plazmin és elasztáz maximális hatása között, míg statikus körülmények között több mint 10-szeres).

4. táblázat: Eltérő szerkezetű fibrin oldási sebessége keringő proteázok hatására.

Fibrin központi csatornáján keresztül plazmin, miniplazmin vagy pankreász elasztáz keringett 500 s^{-1} nyírási sebességgel (mindegyik a 15.A ábra adatai szerint telítő koncentrációban). Az oldási sebességet a fibrin összmenyiségére vonatkoztatott óránként oldott fibrin mennyiségével (%/h, átlag \pm standard hiba) fejeztük ki. Kétszemponos ANOVA alapján egy adott proteáz esetében az eltérő fibrin szubsztrátokon mért oldási sebességek között a különbségek szignifikánsak ($p < 0,05$) [III].

	oldási sebesség (%/h)		
	nem-keresztkötött fibrin	keresztkötött fibrin	keresztkötött fibrin + vérlemezke
150 nM plazmin	$27,4 \pm 0,9$	$19,2 \pm 0,8$	$12,3 \pm 0,4$
150 nM miniplazmin	$29,6 \pm 2,2$	$21,8 \pm 0,9$	$15,2 \pm 1,7$
1,5 μM elasztáz	$20,0 \pm 0,7$	$14,2 \pm 0,9$	$7,6 \pm 0,7$

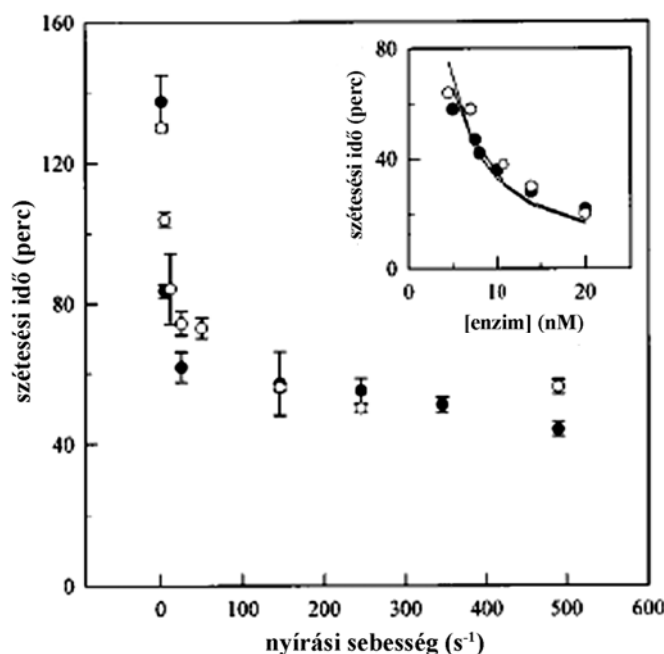
A 4. táblázat adatai szerint a vérlemezkék jelenléte ($95\,000/\mu\text{l}$) szignifikánsan lelassítja a fibrin oldását mindhárom vizsgált proteázzal. A lassítás hátterében a trombocita transzglutamináz szerepét lehet feltételezni, de ugyanakkor látható, hogy a keresztkötött fibrin nem annyira ellenálló a proteázokkal szemben mint a vérlemezke tartalmú fibrin. Ez az eredmény további vérlemezke eredetű tényezők keresését indította, amelyek növelik a trombolitikus rezisztenciát. Ezeket a 4.6 és 4.7 fejezet tárgyalja.



16. ábra: Fibrin oldása az alvadékba beépült proteázokkal áramlás alatt. [III]

A. Proteáz-mentes puffert áramoltattunk 500 s^{-1} nyírási sebességgel olyan fibrin központi csatornáján keresztül, amely 7 nM (I. görbe) vagy 3,5 nM (II. görbe) plazmint tartalmazott, és 280 nm-en mért abszorbancia alapján detektáltuk a degradációs termékeket. A t_d jelöli a szövegben definiált szétválasztási időt. B. Proteáz-mentes puffert áramoltattunk 500 s^{-1} nyírási sebességgel olyan fibrin központi csatornáján keresztül, amely 25 nM (folytonos vonal) vagy 12,5 nM (szaggatott vonal) PMN-elasztázt tartalmazott, és 280 nm-en mért abszorbancia alapján detektáltuk a degradációs termékeket.

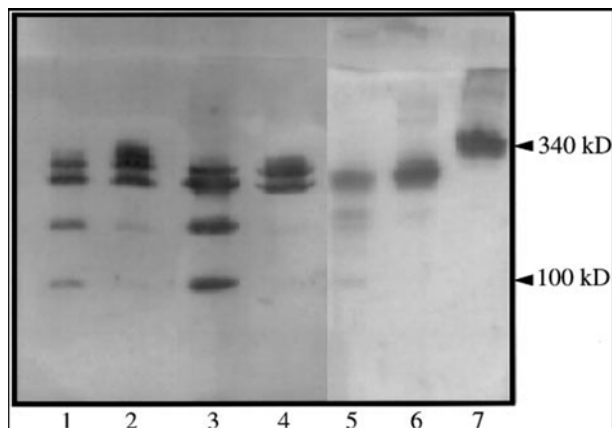
Az alvadékba bekevert plazminnal történő fibrinoldás három jellemző fázison megy keresztül (**16. ábra, A**). Kezdetben az oldékony termékek koncentrációja lineárisan emelkedik (I. fázis). Amikor az A_{280} elér egy adott értéket, az abszorbancia hirtelen nő és ezt az ugrást jelentős abszorbancia oszcillációk követik (II. fázis). E fázis alatt szemmel is meg lehet figyelni az alvadék szétesését apró részecskékre (e részecskék fényszórása okozza az A_{280} kiugrásokat). A korpuszkuláris elemek teljes emésztése után az A_{280} stabilizálódik a fibrin teljes feloldását jelző szinten (III. fázis). E végső A_{280} érték felének eléréséhez szükséges időt tekintjük az alvadék szétesési idejének (t_d). Egy adott nyírási sebesség mellett a t_d csökken a plazmin koncentráció emelésével, de az oldás II. fázisa koncentrációtól függetlenül egy adott A_{280} értéknél kezdődik (**16. ábra, A**). A fibrinbe bekevert miniplazmin a plazminéhoz hasonló fibrinoldási profilt eredményez. A két enzimre jellemző szétesési idők értékeit a **17. ábra** mutatja be. A nyírási sebesség emelésével a plazmin vagy miniplazmin tartalmú fibrin szétesési ideje csökken, ami arra utal, hogy kisebb nyíróerők csak előrehaladtabb emésztettségi stádiumban (vagyis később) képesek szétszedni a fibrin szerkezetét. Érdeemes megjegyezni, hogy már 50 s^{-1} nyírási sebesség mellett is, ami megfelel a nagy vénákban tapasztalt hemodinamikai viszonyoknak [133], jelentősen lerövidül a szétesési idő és így az előzőekben említett „intrinsic” fibrinolízis [114] hozzájárulhat a vénás tromboembolizmus klinikai képéhez.



17. ábra: Nyíróerők hatása plazmin és miniplazmin tartalmú fibrin szétesési idejére. [III]

A fibrin 7 nM plazmint (●) vagy miniplazmint (○) tartalmazott és központi csatornáján keresztül proteáz-mentes puffert áramoltattunk különböző sebességgel. A szétesési idő (t_d) értékét a **16. ábrán** bemutatott módon határoztuk meg. Betétábra: eltérő koncentrációjú proteázt tartalmazó fibrin szétesési ideje 500 s^{-1} nyírási sebességgel áramoltatott pufferben.

Mivel a PMN-elasztáz tartalmú fibrin nem esik szét még az általunk alkalmazott legnagyobb nyírási sebesség mellett sem (**16. ábra, B**), indokolt összehasonlítani a plazmin, miniplazmin és PMN-elasztáz hatására keletkező degradációs termékeket (**18. ábra**).



18. ábra: Proteáz tartalmú fibrinből áramlás alatt keletkező degradációs termékek.

[III]

A 7 nM plazmin, 7 nM miniplazmin vagy 12,5 nM PMN-elasztáz tartalmú fibrin központi csatornáján keresztül 25 s^{-1} nyírási sebesség mellett proteáz-mentes puffert áramoltattunk. Mind a szilárd, mind a folyadék fázisban levő emésztési termékeket 4-15 %-os poliakrilamid gélelektroforézissel azonosítottuk, amihez a mintákat 2 % SDS és 4 M urea tartalmú pufferrel kezeltük. Minták: keringő folyadék fázis a szétesés pillanatában plazmin (1) vagy miniplazmin (3) tartalmú fibrinből; szilárd fázis plazmin (2) vagy miniplazmin (4) tartalmú fibrinből az oldás kezdeti lineáris szakaszából; keringő folyadék (5) és szilárd (6) fázis PMN-elasztáz tartalmú fibrinből a maximális A_{280} érték felénél; proteáz-mentes intakt fibrin (7).

Áramlás alatt a szétesés előtti stádiumban plazminnal és miniplazminnal emésztett fibrin szilárd maradványa főleg nagy molekulatömegű termékeket (250 kDa, ún. fragmentum X) tartalmaz (**18. ábra**). Széteséskor a partikuláris elemeket is tartalmazó folyadékfázisban már kisebb molekulatömegű termékeket detektálunk (150 és 100 kDa, ún. fragmentum Y, ill. D). A PMN-elasztáz által emésztett fibrint akkor vizsgáltuk, amikor A_{280} alapján az összes várható oldékony termék fele már megjelent a folyadékfázisban. Ilyen emésztettségi állapotban mind a keringő, mind a maradvány szilárd fázis a fragmentum Y-nál nagyobb termékekből áll. A fragmentum Y és D korai megjelenése plazmin és miniplazmin hatására magyarázatot adhat arra, hogy áramlás alatt a fibrin alvadék szétesése akkor következik be, amikor az összes fibrin csak kis része ment át oldott fázisba (**16. A ábra**). Így ez az eredményünk [III] összhangban áll azzal a később közölt ténnyel, mely szerint a perfundált fibrin teljes feloldásához az összes fragmentum E – fragmentum D összeköttetés csak 25 %-át elegendő megszüntetni [51], és egyben hangsúlyozza, hogy áramlás alatt nemcsak a hidrolizált peptidkötések száma, hanem ezek térbeli eloszlása is fontos a litikus hatékonyság szempontjából. A PMN-elasztáz hatására keletkező nagyobb méretű degradációs termékek nem teszik lehetővé az alvadék szétesését

még a közepes nagyságú artériákra jellemző hemodinamikai viszonyok között sem, ami ugyan lassú oldáshoz vezet, de *in vivo* trombolízis szempontjából akár előnyös is lehet, mert nem rejti magában az embolizáció lehetőségét.

Áramlás alatt végzett vizsgálataink arra hívták fel figyelmünket, hogy a vérlemezkék trombusok stabilitásában betöltött szerepe még rejthet ismeretlen elemeket, valamint arra, hogy a trombolitikus rezisztencia hátterében érdemes olyan tényezők után kutatni, amelyek a fibrin monomerek és a degradációs termékek közti kölcsönhatásokat befolyásolják. Az ilyen irányba indított kutatásaink eredményeit a 4.6-4.7 fejezetek ismertetik.

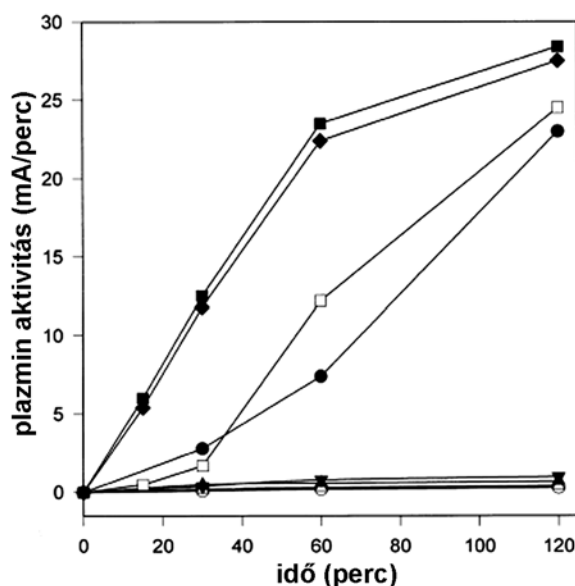
4.5. tPA által katalizált plazminogén aktiváció modulátorai

Az eddig ismertetett eredmények a fibrint közvetlenül bontó proteázok jellemzésére vonatkoztak. Ahogy azonban a Bevezetésben tárgyaltam, a trombolízis általában valamelyik plazminogén aktivátor indítja és ezek közül a tPA hatása erősen függ az aktivációban résztvevő kofaktoroktól. A trombolízis variábilis hatékonyságának hátterében tehát az is állhat, hogy a tPA által katalizált plazminogén aktivációt eddig ismeretlen tényezők is befolyásolhatják. Jelen fejezet a plazminogén aktiváció szabályozására vonatkozó néhány megállapításunkat ismerteti.

4.5.1. Denaturált protrombin

A protrombin egy-láncú glikoprotein (70 kDa molekulatömeg), amely N-terminális Gla-doménből, két kringle doménből és C-terminális katalitikus (trombin) doménből áll [134]. A Gla-domén és az 1. kringle alkotja az ún. protrombin fragmentum-1-t, míg a 2. kringle és a katalitikus domén a pretrombin-1-t. A protrombin egyetlen ismert biológiai szerepe, hogy a trombin prekursoraként szolgál.

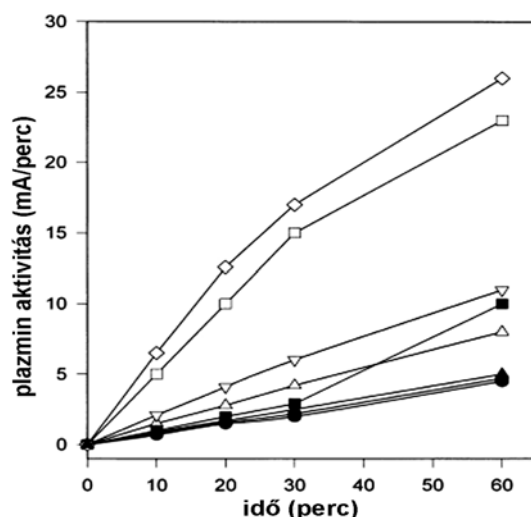
A natív sertés plazminogén, amely a humántól eltérően aszparaginsavat tartalmaz az N-terminálison (Asp-plazminogén), nehezen aktiválható [135,136], amely részben annak tudható be, hogy a 77. pozícióban a humán szekvenciában szereplő Lys helyett Arg található. A Lys – Arg csere miatt a plazmin csak nehezen tudja eltávolítani a pre-aktivációs peptidet és így elmarad a Bevezetésben tárgyalt pozitív visszacsatolás az aktiváció során. Ennek köszönhetően a sertés plazminogén aktivációjakor tisztább formában érvényesülnek a tPA-kofaktor hatások és a natív és des1-77- plazminogént összehasonlítva el lehet különíteni a visszacsatolási mechanizmusokat. Ez indokolta a sertés plazminogén használatát ezekben az aktivációs kísérletekben.



19. ábra: Denaturált protrombin hatása a natív plazminogén aktivációjára tPA-val. [V]

Asp-plazminogént (1,1 μM) aktiváltunk tPA-val (30 nM) különböző protrombin preparátumok jelenlétében (mindegyik 100 μg/ml koncentrációban). A feltüntetett időpontokban az aktivációs elegyben keletkezett plazmin aktivitását Spectrozyme-PL szubsztráton mértük. Hozzáadott preparátumok: semmi (○), natív protrombin (Δ), plazminnal 10 percig előkezelt natív protrombin (▲), plazminnal 18 óráig előkezelt natív protrombin (▼), hő-denaturált protrombin (□), plazminnal 10 percig előkezelt hő-denaturált protrombin (■), plazminnal 18 óráig előkezelt hő-denaturált protrombin (◆), plazminnal 10 percig előkezelt hő-denaturált protrombin és 250 μM 6AH (●). A hő-denaturálás 90 °C-on 5 percig történő kezelést jelöl, a plazmin előkezeléshez pedig 1 mg/ml protrombint 0,1 μM plazminnal 22 °C-on inkubáltunk, amit a plazmin gátlása követett diizopropil-fluorofoszfáttal.

A natív protrombin még plazmin-előkezelés után sem serkenti a tPA-katalizálta plazminogén aktivációt (**19. ábra**). Hő-denaturálás után azonban, egy kezdeti lassabb fázist követően a protrombin jelentősen felgyorsítja az aktivációt és ez a késleltető fázis eltűnik, ha a hő-denaturált protrombint plazminnal előkezeljük. Amennyiben a plazminogén pre-aktivációs peptidet előzetesen plazminnal eltávolítjuk, a denaturált protrombin ennek a des1-77-plazminogénnek az aktivációját is serkenti (**20. ábra**). A hő-denaturált protrombin mellett a hő-denaturált pretrombin-1 is erős tPA-kofaktor, míg a protrombin fragmentum-1 és a trombin még denaturálás után sem serkentik a plazminogén aktivációt (**5. táblázat**). Ezek az adatok a denaturált protrombin 2. kringle doménjére lokalizálják a kofaktor funkciót. A hő-denaturált protrombin hatásában jelentkező kezdeti késleltetés, a plazmin-előkezeléshez köthető serkentés és ennek 6AH-val történő felfüggesztése pedig a plazmin hatására a hő-denaturált 2. kringle-ben exponált lizin oldalláncok szerepére utalnak a kofaktor funkcióban. A natív és des1-77-plazminogén összehasonlítása (**19. és 20. ábra**) arra enged következtetni, hogy bár a pre-aktivációs peptid eltávolítása kedvez az aktivációnak kofaktor hiányában, a kofaktor funkció érvényesülése nem függ össze a jelenlétével.



20. ábra: Denaturált protrombin hatása a des1-77-plazminogén aktivációjára tPA-val. [V]

Des1-77-plazminogént (1,2 µM) aktiváltunk tPA-val (30 nM) plazminnal előkezelt eltérő koncentrációjú protrombin preparátumok jelenlétében. A feltüntetett időpontokban az aktivációs elegyben keletkezett plazmin aktivitását Spectrozyme-PL szubsztráton mértük. Hozzáadott preparátumok: semmi (○), 250 µM 6AH (●), 100 µg/ml natív protrombin (▲), hő-denaturált protrombin 20 µg/ml (Δ), 40 µg/ml (▽), 100 µg/ml (□), 200 µg/ml (◇), 100 µg/ml hő-denaturált protrombin és 250 µM 6AH (■). A hő-denaturálás és a 10 perces plazmin előkezelés a **19. ábránál** leírtak szerint történt.

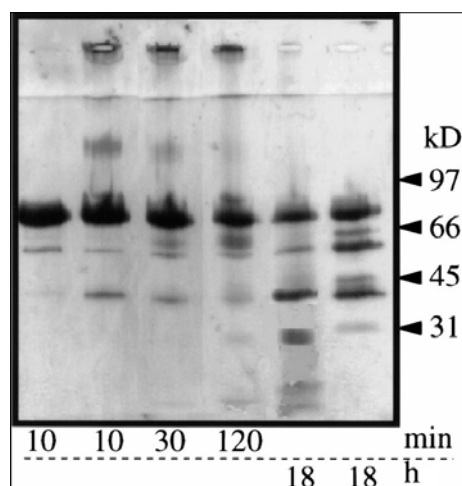
5. táblázat: Protrombin preparátumok hatása a des1-77-plazminogén aktivációjára tPA-val. [V]

A plazminogén aktivációt a **20. ábránál** bemutatott körülmények között végeztük és a 30. percben mért plazmin aktivitást a kofaktor-mentes aktivációban kapott aktivitásra vonatkoztatott arányszámmal fejeztük ki.

100 µg/ml hozzáadott preparátum	Relatív plazmin aktivitás az aktiváció 30. percében
kofaktor nélkül	1,0
natív protrombin	1,3
hő-denaturált protrombin	6,5
hő-denaturált protrombin fragmentum-1	1,2
hő-denaturált pretrombin-1	8,0
hő-denaturált trombin	1,0

Bár a plazmin mind a natív, mind a hő-denaturált protrombint képes bontani (**21. ábra**) a tPA-kofaktor funkció kizárólag a hő-denaturált származékokhoz kötődik. Amennyiben a hő-denaturált protrombin emésztési termékeit gél-filtrációval AcA-34 oszlopon szétválasztjuk, csak az eredetivel megegyező molekulaméretű termékek fejtik ki a kofaktor hatást. Ezek az eredmények indokolták a kofaktor funkció szerkezeti alapjainak részletesebb vizsgálatát, amit albuminon modelleztünk és a következő fejezetben kerül ismertetésre.

Bár eredményeink alapján fel lehet vetni, hogy a trombusban levő leukociták által kiváltott oxidatív stressz körülményei között a protrombin hasonló módon denaturálódik és így pro-fibrinolitikus szerepre tesz szert, ezt nagy óvatossággal és csak érdekes hipotézisként lehet kezelni, amelyre egyelőre nincs *in vivo* adat.



21. ábra: Natív és hő-denaturált protrombin emésztése plazminnal. [V]

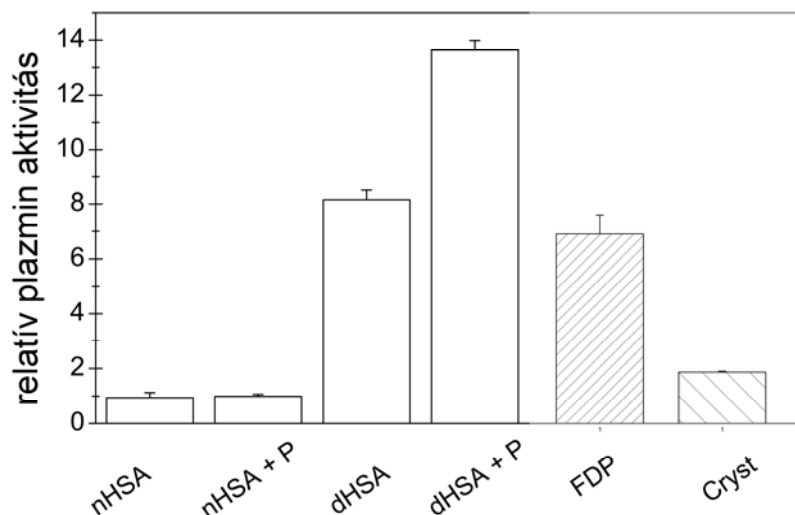
Protrombint (1 mg/ml) plazminnal (60 nM) kezeltünk és a jelzett időpontokban mintákat vettünk ki, amelyeket SDS kezelés után redukció nélkül 10-15 % gradiens poliakrilamid gélen elektroforézissel vizsgáltunk. A bal és jobb oldali szélső minta a natív protrombin emésztését mutatja, a többi a hő-denaturált protrombinét.

4.5.2. Denaturált albumin

Munkacsoportunktól származó korábbi adatok alapján [137] a humán szérum albumin (HSA) hő-denaturálás után az előzőekben ismertett protrombinhoz hasonlóan kofaktorként viselkedik a plazminogén aktivációban. A kísérleti munkánk szempontjából a HSA nagy előnye a protrombinnal szemben, hogy könnyen és nagy mennyiségben elérhető. Továbbá, a HSA hő-denaturációjával együttjáró szerkezeti átalakulások jobban ismertek: a molekulák szét- és újraterkeződnek, instabil szerkezetek aggregátumai jönnek létre intermolekuláris diszulfid hidak vagy intermolekuláris β -redőzött lemezek révén, amelyek relatív szerepe a denaturált HSA végső szerkezetében a denaturálás körülményeitől függően változhat [138-140]. Az utóbbi években napvilágra került adatok az intermolekuláris β -redőzött lemezek jelentőségét hangsúlyozzák a fibrin és amiloid eredetű peptidek valamint glikált albumin kofaktor funkciójában [141,142], de mi a HSA-t modell molekulaként felhasználva további szerkezeti jellemzők után néztünk, amelyek ezért a funkcióért felelősek [XV].

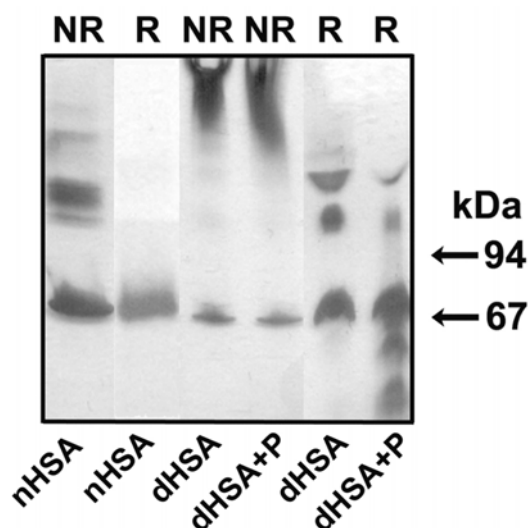
A natív HSA nem mutat kofaktor tulajdonságokat a tPA-katalizálta plazminogén aktivációban (22. ábra). Hő-denaturációt követően azonban a HSA felgyorsítja az aktivációt és a protrombinnal tapasztaltakhoz hasonlóan a plazmin-előkezelés felerősíti ezt a hatást. A natív HSA plazmin-kezelése nem vezet kofaktor tulajdonságok megjelenéséhez. Az előzőekben említett adatok miatt, melyek szerint a kofaktor funkció intermolekuláris β -redőzött lemezek jelenlétéhez köthető, az α -krisztallin kofaktor funkcióját is vizsgáltuk. A natív α -krisztallin 800 kDa körüli oligomerek

formájában létezik, amelyek átlag átmérője 10 nm és β -redőzött lemez tartalmuk jelentős, a polipeptidláncok hosszuk kb. 30 %-ával ilyen szerkezetet alkotnak [143,144]. Bár az α -krisztallin kifejt bizonyos kofaktor hatást, ez nem éri el a denaturált HSA hatását (22. ábra).



22. ábra: Kofaktor hatások a tPA-katalizálta plazminogén aktivációban. [XV]

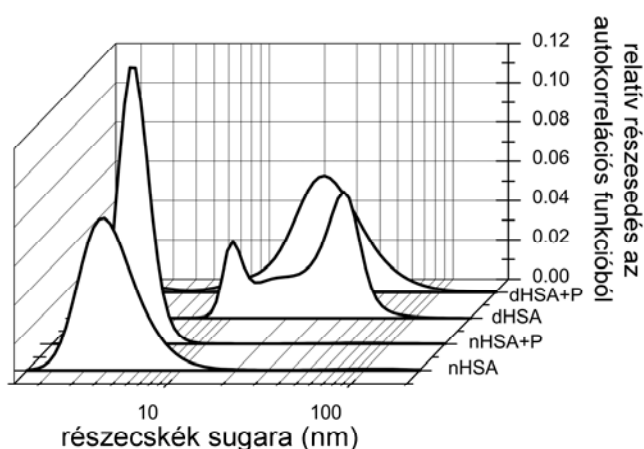
A plazminogén (3,2 μ M) aktivációját tPA-val (74 nM) indítottuk a felsorolt kofaktorok (0,1 mg/ml) jelenlétében és az aktiváció 4. percében Spectrozyme-PL szubsztráton mértük a keletkezett plazmin aktivitását, amelyet relatív egységekben fejeztünk ki (kofaktor nélkül keletkező plazmin aktivitását 1-nek tekintjük). Rövidítések: nHSA, natív HSA; dHSA, HSA denaturált 100 μ M koncentrációban 80 °C-on 90 perc alatt; +P, a kofaktor 0,35 μ M plazminnal történő kezelése 2 h alatt 37 °C-on az aktivációt megelőzően; FDP, CNBr-hasított fibrinogén fragmentumok (a tPA standard kofaktora); Cryst, natív α -krisztallin.



23. ábra: HSA aggregátumok vizsgálata SDS gélelektroforézissel. [XV]

Az SDS gélelektroforézist redukáló (R) és nem-redukáló (NR) körülmények között végeztük 4-15 % gradiens poliakrilamid gélen. Rövidítések: nHSA, natív HSA; dHSA, HSA denaturált 100 μ M koncentrációban 80 °C-on 90 perc alatt; +P, a kofaktor 0,35 μ M plazminnal történő kezelése 2 h alatt 37 °C-on az aktivációt megelőzően.

Az SDS-kezelt minták gélelektroforézise során nem-redukáló körülmények között a HSA mind monomer (67 kDa), mind aggregált (főleg dimer) formában mutatható ki (**23. ábra**). Redukcióval eliminálni lehet az aggregátumokat, ami arra utal, hogy a HSA molekulák közötti diszulfid hidak okozzák a dimer-képzést a „natív” mintában. Ez a „natív” HSA azonban nem rendelkezik kofaktor tulajdonságokkal (**22. ábra**), tehát a monomerek és a kezdeti aggregátumok még nem elegendőek a kofaktor funkcióhoz. Hőkezelés után (80 °C, 90 perc, 100 μ M HSA) a HSA olyan méretű aggregátumokat tartalmaz, amelyek nem lépnek be a poliakrilamid gélbe nem-redukáló körülmények között. A plazmin kezelés önmagában nem eliminálja ezeket az aggregátumokat a kiterjedt emésztés ellenére, ami a redukáló mintákon látszik.

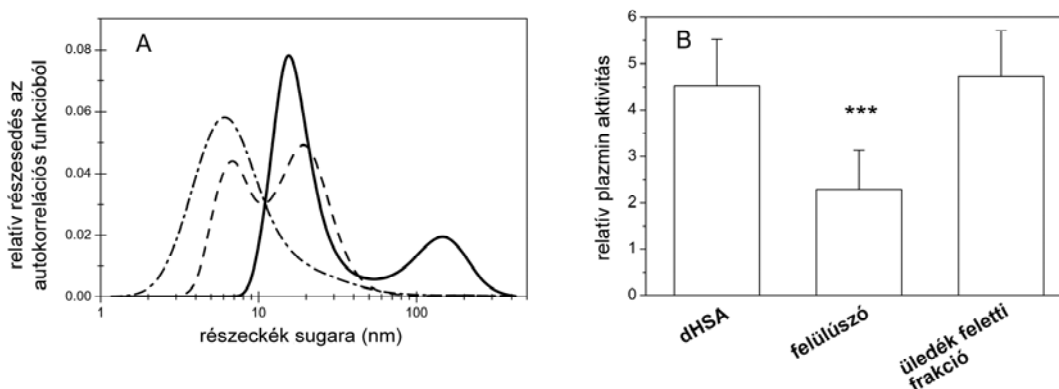


24. ábra: Natív és denaturált HSA preparátumokban levő részecskék méreteloszlása.
[XV]

A HSA preparátumokban levő részecskék méretét dinamikus fényszórás alapján határoztuk meg a [XV] mellékletben leírtak szerint és relatív előfordulásukat ábrázoltuk. Rövidítések: nHSA, natív HSA; dHSA, hő-denaturált HSA; +P, plazmin-kezelt HSA. A denaturáció és plazmin kezelés a **22. ábránál** leírt módon történt.

A natív HSA preparátumban levő részecskék fényszórás alapján becsült sugara a legtöbb esetben 4 nm körüli értékre esik, ami a HSA nagyságú szferikus alakú monomer méretének felel meg (**24. ábra**). Az eloszlási görbe viszont elég tág és átfedi a dimer méretnek megfelelő sugárértéket is (9 nm körül). Plazmin kezelés után a nagyobb méretű részecskék eltűnése miatt az eloszlási görbe szűkül, ami arra utal, hogy ezek jobb szubsztrátjai a plazminnak. Hődenaturációt követően 40 nm sugarú aggregátumok dominálnak az eloszlási görbén, de egy kisebb méretű frakció is jól elkülönül, aminek a 9-10 nm körüli sugara HSA dimernek felel meg. A denaturált HSA plazmin kezelése nyomán az eloszlási görbe maximuma a kisebb sugárértékek felé tolódik, de az átlagméret jóval a dimer nagyság fölött marad, ami arra utal, hogy a nagyobb aggregátumok jobb szubsztrátjai a plazminnak, de mégsem történik kiterjedt emésztés. Ez az eredmény összhangban áll az SDS elektroforézis adataival (**23. ábra**). A denaturáció hatására

megjelenő kofaktor funkció (**22. ábra**) és a részecskeméret alakulása felveti annak lehetőségét, hogy a kofaktor tulajdonság bizonyos részecskeméretet igényel.

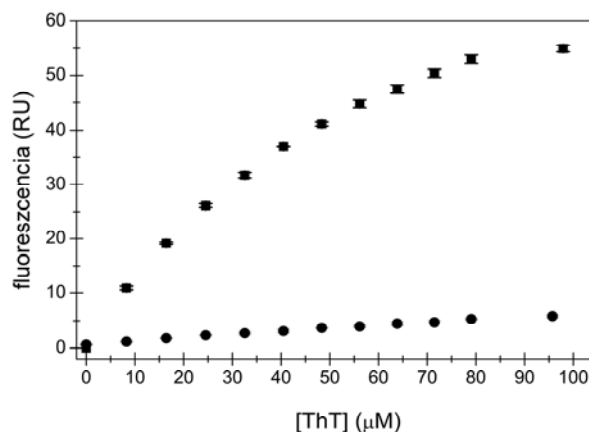


25. ábra: Hő-denaturált HSA tPA-kofaktor tulajdonsága az aggregátum-méret függvényében. [XV]

A hő-denaturált HSA-t (230 μ M, 80 °C, 60 perc) centrifugálással (100.000g, 60 perc) két frakcióra választottuk szét (felső: 50 μ l felülúszó, alsó: 50 μ l üledék felletti frakció) és a részecskeméret eloszlását (A) valamint plazminogén aktivációban kifejtett kofaktor hatást (B) külön-külön frakciónként vizsgáltuk a **24.**, ill. **22. ábránál** ismertetett módon. Az ábra A. részében a folytonos vonal a nem-frakcionált denaturált HSA méreteloszlását mutatja, a szaggatott vonal az üledék felletti frakcióét, a szaggatott és pontozott vonal pedig a felülúszó frakcióét. A B. rész 5 plazminogén-aktiváció mérés átlagát és standard devianciáját mutatja be, a csillagok $p < 0.001$ szignifikancia szintet jelölnek.

Centrifugálást (10^5 g, 60 perc) követően a hő-denaturált HSA két frakcióját vizsgáltuk párhuzamosan tPA-kofaktor hatás és részecskeméret tekintetében: felülúszó, amely a centrifugálásba bevitt fehérje 13 %-át tartalmazta, és üledék felletti frakció, amely a bevitt fehérje 17 %-át tartalmazta (**25. ábra**). A centrifugálás mindkét frakcióból eltávolítja a 100 nm-nél nagyobb sugarú aggregátumokat és jelentősen csökkent a 10 – 100 nm sugarú részecskék arányát a felülúszóban. Az üledék felletti frakcióban található részecskék mérete megfelel a dimerek, ill. a két, három, vagy több monomerből álló aggregátumok méretének. A felülúszó, amely főleg monomer és dimer nagyságú részecskéket tartalmaz, szignifikánsan gyengébb kofaktor hatást fejt ki mint az üledék felletti frakció. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az aggregátumok csak bizonyos küszöbméret felett képesek kofaktor funkcióra. Ahogy fibrin esetében jól ismert [145], a kofaktor megfelelő pozícióban köti meg a plazminogént és a tPA-t így biztosítva az aktivációhoz optimális orientációt. Ebből következik, hogy ehhez megfelelő nagyságú felszínre van szükség.

A tioflavin-T rendezett β -redőzött lemezekhez kötődik és ennek következtében fluoreszcenciája emelkedik. E tulajdonság alapján a tioflavin-T használható ismétlődő anti-parallel β -redőzött szerkezetek és szabálytalan aggregátumok elkülönítésére [146]. Vizsgálatainkban a tioflavin-T kötődés alapján összehasonlítottuk a különböző HSA preparátumok β -redőzött lemez tartalmát (**26. ábra**).



26. ábra: HSA β -redőzött lemez tartalma tioflavin-T kötődés alapján. [XV]

2 μ M hő-denaturált (■) vagy natív (●) HSA-hoz eltérő koncentrációban tioflavin-T-t adtunk hozzá és a fluoreszcenciát (excitáció 450 nm, emisszió 482 nm) mértük.

Emelkedő tioflavin-T koncentráció mellett a natív HSA fluoreszcenciája alig változik (26. ábra). A hő-denaturált HSA esetében viszont a fluoreszcencia drámaian emelkedik, ami ismétlődő β -redőzött szerkezetek jelenlétére utal az albumin aggregátumokban. A kofaktor hatás (22. ábra) és a HSA preparátumon tioflavin-T alapján becsült β -redőzött tartalma közötti párhuzam összhangban áll az amiloiddal és glikált albuminnal kapcsolatban közölt adatokkal [141,142]. Az α -krisztallin magas β -redőzött lemez tartalma és relatíve gyenge kofaktor hatása (22. ábra) viszont arra hívja fel a figyelmet, hogy valószínűleg nem önmagában a β -redőzött szerkezet, hanem az általa fenntartott aggregátumok nagyobb mérete is szükséges a kofaktor funkcióhoz. Ráadásul a hő-denaturált HSA esetében az intermolekuláris β -redőzött szerkezet nem az egyetlen tényező, amely összetartja az aggregátumokat. A 23. ábra tanúsága szerint a diszulfid hidak redukciója is szükséges a hő-denaturált HSA aggregátumok szétszedéséhez, ami megfelel a korábbi tapasztalatnak, hogy a HSA 34. pozíciójú cisztein szabad SH csoportjának blokkolása mérsékli az irreverzibilis denaturációt [138]. Így bár a β -redőzött szerkezet jelenléte szükséges, de nem ez az egyetlen feltétele a denaturált HSA kofaktor funkciójának.

A HSA plazmin kezelése nem befolyásolja a tioflavin-T függő fluoreszcenciát (a 26. ábrán nem tüntettük fel ezeket az adatokat, mert pontosan megegyeznek a nem kezelt minták adataival) és mérsékelten csökkenti az aggregátumok méretét (24. ábra). Így a plazmin kofaktor-funkciót erősítő hatása (22. ábra) nem magyarázható a fentiekben tárgyalt β -redőzött szerkezettel és részecskemérettel. Ugyanakkor ez a hatás nem meglepő, hiszen a plazmin lizin melletti peptid kötéseket hasít és így módon a denaturált HSA aggregátumokban új C-terminális lizin oldalláncok válnak hozzáférhetővé a plazminogén

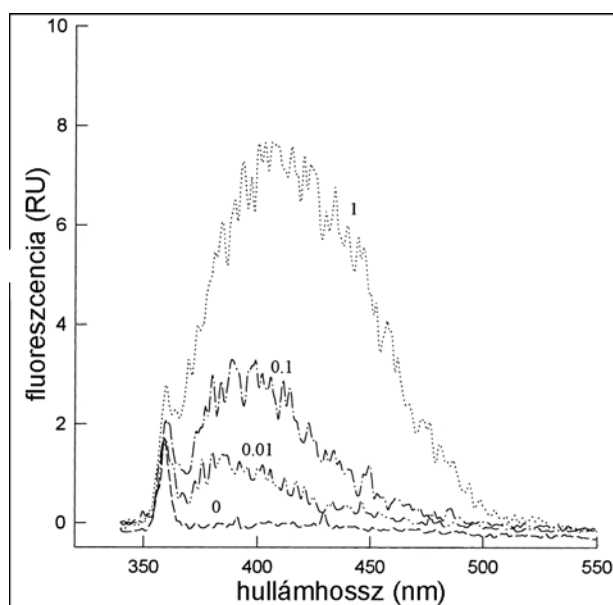
számára, aminek pozitív hatását a plazminogén aktivációra már ismertettem a Bevezetésben a fibrin kofaktor funkciója kapcsán.

A HSA-val végzett modellkísérleteink igazolják, hogy a fehérjék denaturálása során olyan szerkezeti átalakulások történnek, amelyek a plazminogén aktivációban kofaktor tulajdonságként jelennek meg. Mivel a trombusokban és általában a gyulladásos folyamatokban az oxidatív stressz által kiváltott denaturáció egészen változó mértékű lehet, feltehetőleg *in vivo* a tPA rendkívül heterogén kofaktor-környezetben működik és így eltérő hatásfokú lehet az általa katalizált plazminogén aktiváció.

4.5.3. Plazminogén kovalens módosítása metilglioxállal

Az előzőekben ismertetett vizsgálatokkal a plazminogén aktiváció modulációját az alternatív kofaktorok oldaláról közelítettük meg. *In vivo* azonban azzal is lehet számolni, hogy a zimogén különböző fokú poszt-transzlációs módosításokon megy keresztül, amelyek egyes patológiás állapotokban befolyásolhatják aktiválhatóságát vagy a módosított zimogénből keletkező plazmin aktivitását. A diabetes mellitus közismerten olyan állapot, amelyben a nem-enzimatisz fehérje-módosítások legalább részben felelősek a betegség késői szövődményeiért. Ezek nemcsak glukóz részvételével zajlanak, hanem más vegyületekkel is, amelyek a glukóznál kisebb koncentrációban fordulnak elő, de nála reaktívabbak. A metilglioxál olyan α -oxoaldehid, amely könnyen módosítja a fehérjék szulfhidril, amino és guanidin oldalláncait (cisztein, lizin, arginin) [147]. Diabéteszben az indukált CYPIIE1 izoenzimek hatására keletkezhet acetontól vagy a felszaporodott trióz-foszfátokból keletkezik, plazmaszintje elérheti a 10 μ M értéket is [148,149]. Figyelembe véve a plazminogén 5 órás fél-életidejét a keringésben [150] és azt a lehetőséget, hogy a plazminogén bioszintézisének színhelyén, a májban a CYPIIE1 hatására nagyságrendekkel magasabb metilglioxál koncentrációk is előfordulhatnak, indokoltnak tűnik megvizsgálni a plazminogén fogékonyságát metilglioxállal történő módosításra és ennek funkcionális következményeit az aktiváció és a plazmin aktivitás tekintetében [VI].

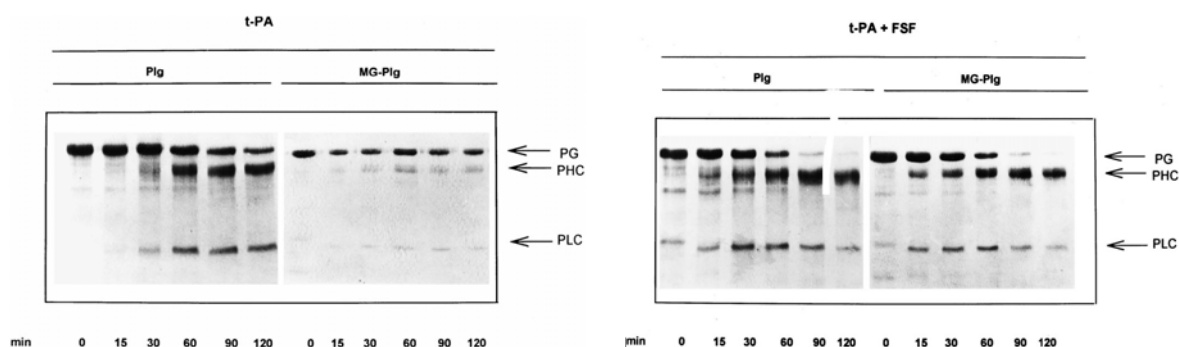
Fehérjék metilglioxállal történő kezelése új fluorofor csoportok megjelenéséhez vezet, amelyek excitációs maximuma 320 nm, emissziós maximuma 400 nm körül található [151,152]. A metilglioxál és arginin reakciójának terméke argpirimidin, amelynek fluoreszcencia spektruma hasonlít a metilglioxállal módosított krisztallin és albumin fluoreszcenciájára [153]. Metilglioxál kezelést követően a plazminogén fluoreszcencia spektruma is hasonlóan változik (27. ábra), amely jelzi, hogy a plazminogén is érzékeny metilglioxál módosításokra.



27. ábra: Metilglioxállal módosított plazminogén fluoreszcencia spektruma. [VI]

Plazminogént (5 μ M) inkubáltunk különböző koncentrációjú metilglioxállal 37 °C-on 3 órán át, ezt követően a szabad metilglioxált dialízissel eltávolítottuk. Az emissziós spektrumot 320 nm-en történő excitációnál vettük fel. A görbék melletti számok a metilglioxál koncentrációját jelölik mM-ban.

Mivel a [VI] mellékletben közölt adataink szerint a metilglioxállal módosított plazminogénből keletkező plazmin kinetikai tulajdonságai is megváltoznak, az aktiváció nyomonkövetése plazmin aktivitás alapján csak a módosított plazmin kalibrálása után lehetséges. Ilyen esetben a plazminogén – plazmin átalakulás lefolyásáról közvetlen információt a redukáló körülmények között végzett gélelektroforézis ad, amely az egyláncú zimogénnek és a kétláncú aktív formájának relatív mennyiségét detektálja (28. ábra).



28. ábra: Metilglioxál által módosított plazminogén aktivációja tPA-val. [VI]

A plazminogént (5 μ M) 1 mM metilglioxállal kezeltük 1 órán át 37 °C-on. Ezt követően dialízissel eltávolítottuk a szabad metilglioxált és a plazminogén aktivációt 75 nM tPA-val indítottuk 200 μ g/ml FSF (CNBr-hasított fibrinogén fragmentumok) jelenlétében vagy hiányában. Az aktiváció jelzett időpontjaiban vett mintákban SDS és β -merkaptóetanol kezelés után 12 %-os poliakrilamid gélen elektroforézissel szétválasztottuk az aktivációs termékeket. Rövidítések: PG, plazminogén; PHC, plazmin nehéz lánc; PLC, plazmin könnyű lánc; MG-PLG, metilglioxál-módosított plazminogén; PLG, natív plazminogén.

Az egyláncú plazminogén kétláncú plazminná átalakulása (28. ábra) jelentősen lelassul a denzitometriás értékelés adatai szerint (6. táblázat).

6. táblázat: Plazminogén – plazmin átalakulás tPA hatására. [VI]

A 28. ábrán bemutatott kísérletek denzitometriásan értékeltük ki és az egyes mintákban előforduló fehérjeláncok mennyiségét (optikai denzitás szorozva a csík területével) mutatjuk be relatív egységekben (egy adott mintában levő összes fehérje gélen mért optikai szignál alapján becsült mennyiségét tekintjük 100 %/nak). Rövidítések: a 28. ábrának megfelelően.

Aktivációs idő (perc)	Plazmin mennyiség (az összfehérje %-ában)			
	Plg	MG-Plg	Plg+FSF	MG-Plg+FSF
30	28	18	44	44
60	37	23	46	47
90	48	25	50	51
120	54	27	54	55

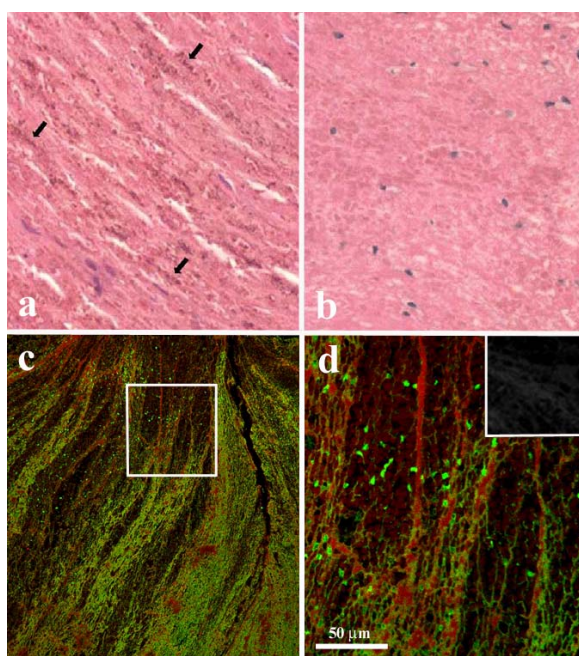
A fibrinogén CNBr-al hasított fragmentumai, amelyek a tPA hatékony kofaktorai a plazminogén aktivációban, teljesen felfüggesztik a metilglioxál módosítás gátló hatását (6. táblázat). Ez az eredmény arra utal, hogy a fluoreszcencia spektrumban (27. ábra) tükröződő szerkezeti módosítás a plazminogén molekulában olyan konformáció változashoz vezet, amelynek következtében a zimogén kevésbé érzékeny tPA-ra, de nem érinti kölcsönhatását a kofaktorról. Így a fibrinogén fragmentumok képesek helyreállítani a plazminogén aktiválhatóságát.

Az általunk leírt kovalens módosítás gyakorlati jelentősége abban rejlik, hogy a terápiás trombolízisnél olyan plazminogén aktivátorokat is alkalmaznak, amelyek hatásmechanizmusa nem igényel kofaktort (pl. streptokináz, urokináz). Így a terápiás válasz egészen változó lehet, amikor ezek a fibrinolitikus ágensek a beteg szervezetében esetleg módosított plazminogénre fejtik ki hatásukat. Egyben eredményeink arra is felhívják a figyelmet, hogy még rövid életidejű fehérjék esetén is *in vivo* számolni lehet a fehérje-öregedés jelenségével, ha ez alatt a natív szerkezet fokozatos elvesztését értjük, hiszen kísérleteinkben alkalmazott inkubációs idők és anyagkoncentrációk összevethetők a plazminogén életidejére és metilglioxál *in vivo* koncentrációjára vonatkozó adatokkal.

4.6. A miozin fibrinolízist moduláló szerepe

A következő fejezetekben egy-egy modulátor anyag komplex hatását ismertetem a 3. oldalon felvázolt séma két fázisában szereplő enzimek működésére. Így remélhetőleg egységes kép fog kialakulni a trombolízisben betöltött szerepükről. A vizsgált modulátor anyagok egy része a trombusokban előforduló sejtes elemekből származik. A vérhez képest a trombusokban 20 – 30-szorosára is megnő az egységnyi térfogatra jutó vérlemezke szám (10 ml vérben levő trombociták 400 μ l artériás trombusban koncentrálnak be [154]). Így ha azzal számolunk, hogy a miozin a trombocita-fehérje tömegének 5 %-a [155], ez azt jelenti, hogy az artériás trombusokban a miozin koncentráció 0,5 – 1 μ M körül lehet, ami nem sokkal marad el a fibrin monomer

koncentrációjától (3 – 5 μM). A trombocita citoskeletonja képes fibrinhez kötődni [156] és aktivációjuk során a vérlemezkek filopódiumokat képeznek a fibrinrostok köré, amelyekben vastag miozin filamentumok rendeződnek [157]. Két órával a trombus iniciációja után trombocita-nekrózis morfológiai jeleit lehet megfigyelni artériás trombusokban és 6 órával később a szétesett vérlemezkek dominálják a trombusok elektronmikroszkópos képét [154]. Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy ezzel párhuzamosan semmilyen jelét nem lehet megfigyelni annak, hogy 12 h-val a trombus keletkezése után a fibrin lebontása elkezdődött volna [154]. Tehát a néhány órás artériás trombusokban azzal lehet számolni, hogy a vérlemezkek citoplazma tartalma bekeveredik a fibrinháló szerkezetébe. E felvetés tesztelése végett vizsgáltuk miozin jelenlétét sebészileg eltávolított trombusokban (**29. ábra**).



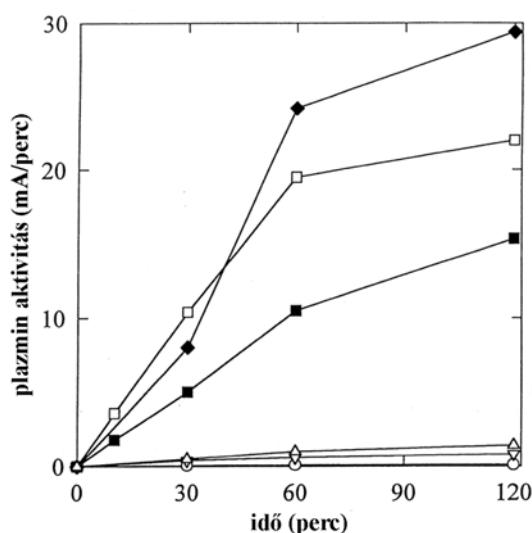
29. ábra: Artériás trombusok miozin tartalma. [IX]

Humán *arteria iliaca*-ból kivett trombusban vizsgáltuk miozin jelenlétét. Az *a*) részben a használt immunhisztokémiai reakcióval [IX] barnára festődő miozin pontszerű lerakódásokat (nyilak) képez a vörösvértestek mellett. A *b*) rész negatív kontroll, amelyet az *a*) részben bemutatott metszettel azonos módon kezeltünk, de az anti-miozin antitestet alkalmazás előtt ezerszeres moláris feleslegben miozinnal kezeltük. Az *a*) és *b*) részben a nagyítás 400 \times . A *c*) (20 \times eredeti nagyítás) és *d*) (40 \times eredeti nagyítás) rész ugyanerről a trombusról készült immunofluoreszcens konfokális lézermikroszkópos képek, amelyeken a miozin zölden, a fibrin pirosan festődik [IX]. A *c*) képen bekeretezett rész került nagyításra a *d*) képen, az utóbbi bekeretezett része pedig az autofluoreszcencia vizsgálatára készült kontroll metszet, amelyet azonos módon kezeltünk, de kihagytuk a primer anti-miozin és anti-fibrin antitesteket.

Immunohisztokémiai festéssel masszív miozin jelenlétet lehet kimutatni artériás trombusokban (**29. ábra, a**). Bár a miozin sejtforrását nem lehet azonosítani ilyen módon, a pontszerű lerakódások mérete és elhelyezkedése leginkább vérlemezke eredetre utal. A miozin és fibrin relatív előfordulásának értékeléséhez kettős immunofluoreszcens festést alkalmaztunk (**29. ábra, c és d**). A nagy felbontású konfokális mikroszkópos kép a

fibrinrostokat átszövő finom miozin hálót mutat. A fibrin és miozin aránya egészen eltérő lehet akár egy látótéren belül is.

E megfigyelések fényében indokoltnak tűnik a fibrinolitikus rendszer vizsgálata miozin jelenlétében. Először izoláltan a plazminogén aktivációt közelítettük meg (**30. ábra**).



30. ábra: Miozin hatása a tPA-katalizálta plazminogén aktivációra. [I]

A plazminogén (1,1 μM) aktivációját 30 nM tPA-val indítottuk és a jelzett időpontokban a keletkezett plazmin aktivitását mértük Spectrozyme-PL szubsztráton. Az aktivációs elegyhez hozzáadott anyagok: semmi (○), 0,2 μM miozin (◆), 0,1 μM miozin C-terminális (rúd) fragmentuma (□), 0,1 μM miozin rúd + 250 μM 6AH (■), 1 μM miozin N-terminális (S-1) fragmentuma (Δ), 1,4 μM natív albumin (▽).

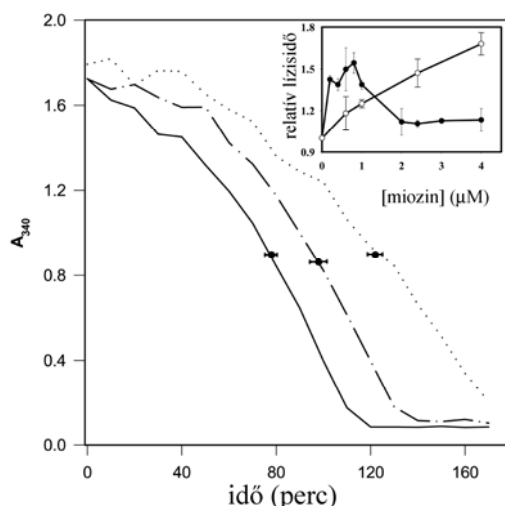
Miozin jelenlétében a tPA-katalizálta plazminogén aktiváció felgyorsul (**30. ábra**). Ez a hatás a miozin molekula C-terminális részéhez (tripszin emésztést követően izolált ún. rúd fragmentum) kötődik, míg az N-terminális (S-1) fragmentum nem befolyásolja a plazminogén aktivációt. 6AH mikromoláris koncentrációban felfüggeszti a fibrin kofaktor funkcióját [75] és ehhez hasonlóan, a mi adataink szerint mérsékli a miozin kofaktor hatását (**30. ábra**). Az urokináz-katalizálta aktivációt a miozin nem befolyásolja (**7. táblázat**).

7. táblázat: Miozin hatása a des1-77-plazminogén aktivációjára tPA-val és urokinázzal. [I]

A plazminogén (1,1 μM) aktivációt 30 nM tPA-val vagy 10 nM urokinázzal végeztük és a 30. percben mért plazmin aktivitást az adott aktivátorral kofaktor-mentes aktivációban kapott aktivitásra vonatkoztatott arányszámmal fejeztük ki.

100 μg/ml hozzáadott preparátum	urokináz	tPA
natív albumin	1,3	1,7
miozin	1,8	7
miozin rúd fragmentum	2,2	9
miozin S-1 fragmentum	1,7	2
fibrinogén CNBr-fragmentum	-	10

A fenti eredmények fényében meglepő, hogy a fibrinolízis lelassul miozin jelenlétében, ha a plazminogén tartalmú fibrin oldását tPA-val indítjuk (**31. ábra**). 0,2 μM miozin $78 \pm 4,8$ percről $122 \pm 5,7$ percre emeli a lízisidőt ($p < 0,001$), míg 10-szer magasabb miozin koncentrációnál ez a gátlás mérsékeltebb ($t_{1/2} = 98 \pm 7,2$ perc), de szignifikáns ($p < 0,001$).



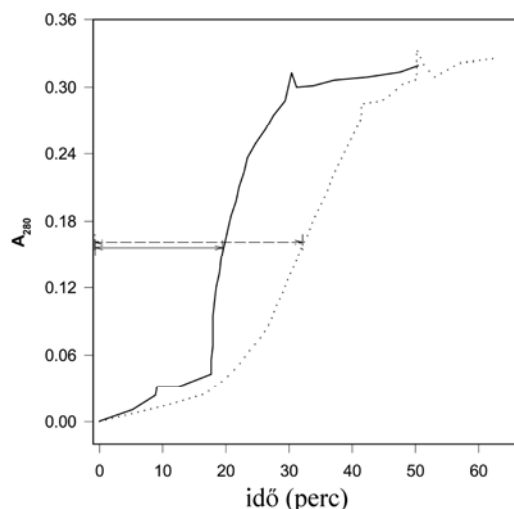
31. ábra: Plazminogén aktivátorokkal indított fibrinoldás miozin jelenlétében. [IX]

Plazminogén és miozin tartalmú fibrin felszínére 0,3 μM tPA-t rétegeztünk rá és az alvadék turbiditását követtük 340 nm-en. A miozin koncentrációja 0 (folytonos vonal), 0,2 μM (pontosított vonal) vagy 2 μM (szaggatott és pontosított vonal). A szimbólumok a lízisidőt jelölik (5 mérés átlaga és standard devianciája). Betétábra: relatív lízisidő (1-nek tekintjük a miozin-mentes fibrinen adott aktivátorral mért értéket) a miozin koncentráció függvényében, amikor a fibrin felszínére 0,3 μM tPA (kitöltött szimbólumok) vagy 0,15 μM urokináz (üres szimbólumok) került.

A tPA-indukálta fibrinolízis maximális gátlása 0,6 – 1,0 μM miozin mellett lép fel és magasabb miozin koncentrációknál mérséklődik (**31. ábra, betét**). Ha a fibrinoldást urokinázzal indítjuk, amely nem igényel kofaktort a plazminogén aktivációhoz, a lízisidő lineárisan nő a miozin koncentráció függvényében. Ezen eredmények alapján arra lehet gondolni, hogy egyfelől a miozin a keletkező plazmin fibrinre kifejtett aktivitását befolyásolja (így gátlást tapasztalunk a fibrinoldásban), másfelől viszont a miozin a fibrinnel lép kölcsönhatásba és emiatt az előzőekben ismertetett tPA-kofaktor szerepe csak magasabb koncentrációknál tud érvényesülni. E hipotézis tisztázására két irányban végeztünk kísérleteket: a plazmin aktivitását jellemeztük miozin jelenlétében és a fibrin – miozin kölcsönhatásokat vizsgáltuk.

Amikor a fibrin oldása az alvadékba belekevert plazmin hatására történik, a 4.4 fejezetben tárgyalt kétfázisú lefolyást lehet megfigyelni (**32. ábra**): az oldékony termékek kezdeti lineáris emelkedését hirtelen szétesés követi. A miozin mindkét fázis menetére hat. Az első fázisban az A_{280} változásának sebessége $0,14 \text{ h}^{-1}$ ($0,132 - 0,145 \text{ h}^{-1}$, $n=3$) értékről $0,10 \text{ h}^{-1}$ ($0,088 - 0,121 \text{ h}^{-1}$, $n=3$) értékre csökken 2 μM miozin jelenlétében. A szétesés a

fibrin szerkezetre jellemző emésztettségi stádiumban kezdődik, amely miozin nélkül a teljes feloldásnál megfigyelt A_{280} érték 13 %-ánál (12,4 – 13,5 %) lép fel, míg miozin jelenlétében ez a küszöbérték majdnem a felére csökken 7,2 % (6,5 – 8,2 %).

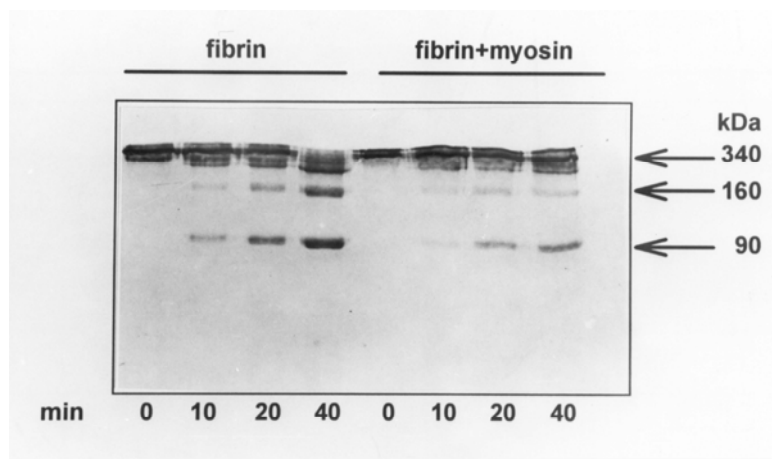


32. ábra: Miozin tartalmú fibrin oldása áramlás alatt. [IX]

A 4.4. fejezetben leírt kísérletekhez hasonlóan henger alakú fibrin készült, amely 10 nM plazmint is tartalmazott, és a központi hosszanti csatornáján keresztül 400 s^{-1} nyírási sebességgel puffert áramoltattunk. A keringő oldat abszorbanciáját mértük folyamatosan 280 nm-nél. A folytonos vonal a $6 \mu\text{M}$ fibrin oldását ábrázolja, a szaggatott vonal pedig a $2 \mu\text{M}$ miozint is tartalmazó $6 \mu\text{M}$ fibrin (minden görbe 3 mérés medián mintája). A nyilak a szétesési időt jelölik.

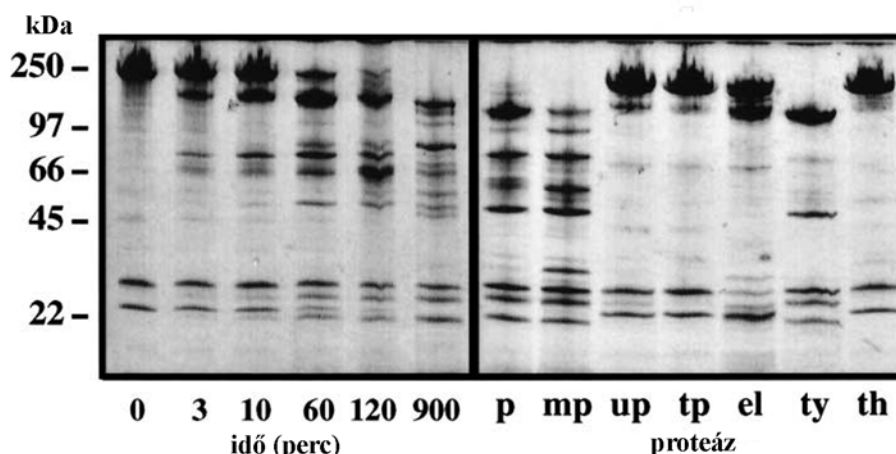
A miozin módosítja a szétesési fázist is: az emelkedés meredeksége csökken és így a szétesési idő 20 percről (19 – 22 perc) 33 percre (31 – 35 perc) hosszabbodik meg. Az áramlás alatt vizsgált fibrinoldás kettős miozin hatásra utal. Egyfelől a szétesés alacsonyabb A_{280} küszöbértéknél kezdődik, ami jelzi, hogy a miozin jelenléte csökkenti a nagyobb fibrin degradációs termékeket összetartó kölcsönhatásokat és így adott nyíróerő mellett ezek már nem maradhatnak a polimer szerkezetében. Másfelől a lassabb kezdeti oldási fázis és a hosszabb szétesési idő felveti a miozin gátló hatásának lehetőségét, amely a plazmin csökkent fibrinolitikus aktivitásaként jelentkezik. Ez utóbbi statikus körülmények között is igazolható (33. ábra): a fibrin lebontása jelentősen lelassul miozin jelenlétében. Áramlás alatt a két ellentétes hatás eredője a fibrin stabilizálása a plazmin hatással szemben (32. ábra): a polimerizációs erők gyengülése nem képes kompenzálni a lassabb fibrin emésztést.

A fenti látszólagos gátlás hátterében a miozin és a fibrin közötti kompetíció áll. Fibrin hiányában a miozin érzékeny szubsztrátja a plazminnak (34. ábra): 1:13 moláris arányban plazmin hatására 1 óra alatt szobahőmérsékleten legalább 7 jól elkülönült proteolitikus termék keletkezik a miozinból. Más proteázokkal összehasonlítva a miozin emésztése plazminnal specifikusnak tűnik, a 34. ábrán vizsgált proteázok közül csak a miniplazmin képes összevethetően kiterjedt miozin lebontásra.



33. ábra: Fibrin emésztése plazminnal miozin jelenlétében. [IX]

A fibrint ($3 \mu\text{M}$), amely adott esetben $2 \mu\text{M}$ miozint is tartalmazott, 10 nM plazminnal emésztettük és a jelzett időpontokban a reakciókat leállítottuk főzéssel 8 M urea és 2% SDS tartalmú puffer hozzáadása után. A degradációs termékeket elektroforézissel 10% -os poliakrilamid gélen szétválasztottuk nem-redukáló körülmények között.



34. ábra: Miozin emésztése különböző proteázokkal. [I]

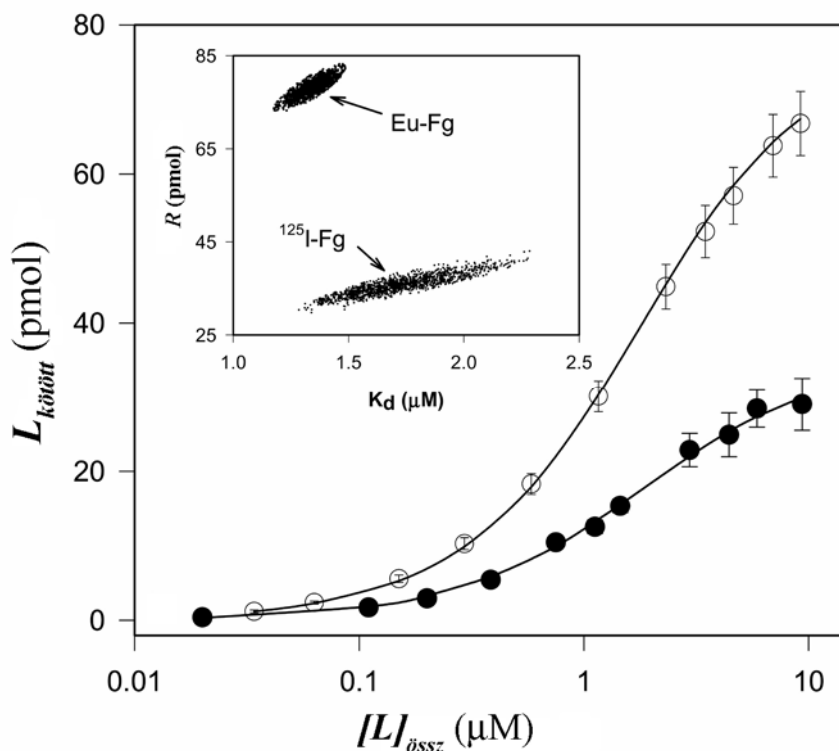
Baloldali rész: A miozint ($1,6 \mu\text{M}$) $0,12 \mu\text{M}$ plazminnal emésztettük és a jelölt időpontokban vett mintákat SDS kezelés után $4 - 15 \%$ gradiens poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk redukáló körülmények között.

Jobboldali rész: A miozint ($1,6 \mu\text{M}$) $0,2 \mu\text{M}$ proteázzal emésztettük 3 órán keresztül és a mintákat azonos módon vizsgáltuk. Rövidítések: p, plazmin; mp, miniplazmin; up, urokináz; tp, tPA; el, pankréasz elasztáz; ty, tripszin; th, trombin.

A 4.2 fejezetben leírt megközelítés alkalmazásával, a miozin és a szintetikus plazmin szubsztrát Spectrozyme-PL kompetíció alapján sikerült meghatározni a plazmin látszólagos K_M értékét miozin szubsztráton [I]. A $3,2 \mu\text{M}$ -os érték azt jelzi, hogy a plazmin affinitása miozin iránt gyengébb mint a fibrin iránt (fibrinre nézve a K_M $0,14 \mu\text{M}$ [XXXIV]), de ilyen affinitás különbség mellett is képes a miozin hatékony kompetícióra, amelynek következményét a 33. ábrán látjuk.

A 31. ábrán bemutatott megfigyelések felvetik a fibrin és miozin közötti kölcsönhatás lehetőségét. Emellett szól az a megfigyelésünk is, hogy ultracentrifugálásnál a miozin felgyorsítja a fibrinogén és fibrin monomerek (amelyek GPRP peptid jelenlétében

nem polimerizálódnak [158]) ülepitését. $10^5 \times g$ gyorsulásnál 2 h alatt a miozin teljes mértékben leülepíthető a folyadékfázisból, míg a fibrinogén és a fibrin monomerek koncentráció gradienst képeznek. Ha viszont előinkubált miozin-fibrin(ogén) keveréket centrifugálunk, a felső (a centrifugált térfogat 40 %-át képező) réteg fehérjetartalma 20 – 25 %-al csökken a miozin-mentes felülúszókhoz képest. Az interakciók erősségét két módszerrel közelítettünk meg (jelölt fehérjék alkalmazásával, illetve SPR szignál alapján).

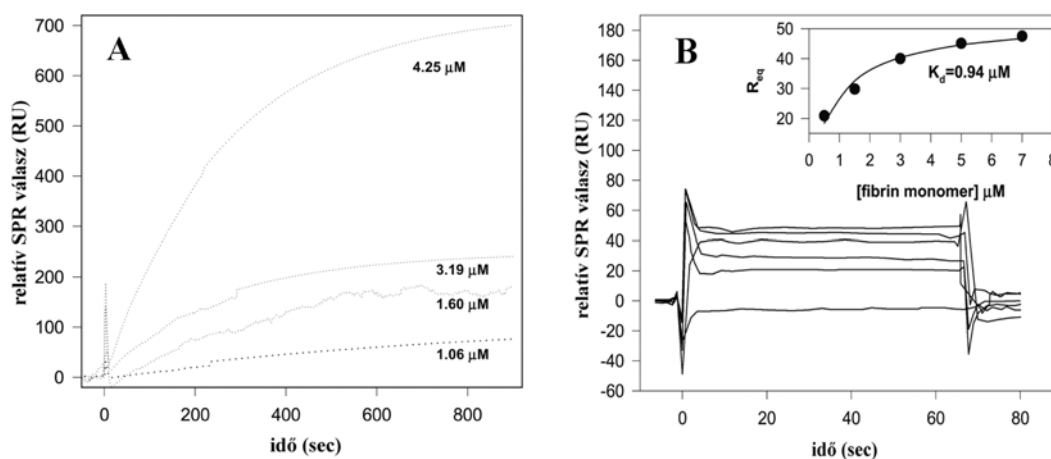


35. ábra: Fibrinogén kölcsönhatása immobilizált miozinnal. [IX]

Azonos koncentrációjú ^{125}I -fibrinogén (kitöltött szimbólumok) vagy Eu-fibrinogén (üres szimbólumok) változó koncentrációjú jelöletlen fibrinogénnel összekeverve került rá a miozinnal bevont felszínre 2 órára $[L]_{\text{össz}}$ összesített koncentrációban, ezt követően rövid mosás után a jelölésnek megfelelő szignált mértük a miozin felszínen, amely alapján (és az alkalmazott oldat jelölt/jelöletlen fibrinogén arányát felhasználva) meghatároztuk a kötött fibrinogén mennyiségét ($L_{\text{kötött}}$). A görbék a legjobb illesztést mutatják a 3.4.1 fejezetben leírt egyenletrendszer szerint. Érdekes megjegyezni, hogy az újszerű matematikai értékelésnek köszönhetően az illesztéshez használt független változó ($[L]_{\text{össz}}$) nem hordoz mérési hibát. Betétábra: a mért $L_{\text{kötött}}$ adatok szórásának felhasználásával készült 1500 Monte Carlo szimulációs illesztés eredményeként nyert paraméterek a modell egyenletei szerint (K_d , miozin-fibrinogén disszociációs egyensúlyi állandója; R , miozin kötőhelyek száma a felszínen).

Egyfajta kötőhelyet feltételezve, a 35. ábra egyensúlyi kötődési adatai alapján a K_d legjobb becslése $1,70 \mu\text{M}$ ($1,28 - 2,29 \mu\text{M}$ 90 %-os konfidencia tartomány) a ^{125}I -fibrinogénnel végzett mérés esetén és $1,35 \mu\text{M}$ ($1,17 - 1,49 \mu\text{M}$ 90 %-os konfidencia tartomány) az Eu-fibrinogénnel végzett mérés esetében. Ha olyan modellt alkalmazunk, amely két eltérő affinitású kötőhelyet feltételez, az illesztés nem javul szignifikánsan, ezért ezt a lehetőséget elvetettük (a modelldiszkrimináció jelentőségére visszatérünk később a

4.7.3 fejezetben egy pozitív példával). A **35. ábra betétje** jól szemlélteti a Monte Carlo szimuláción alapuló statisztikai analízis előnyeit. Mivel az 1500 szimuláció hűen tükrözi a kísérleti módszerben rejlő variabilitást, a szimuláció alapján meghatározott paraméter-párok eloszlása reális képet ad az értékelés megbízhatóságáról. Így az ábráról leolvasható, hogy az Eu-fibrinogénnel végzett meghatározás precízebb értékeket szolgáltat a ^{125}I -fibrinogénhez képest. Ugyanakkor a két eloszlás átfedéséből (K_d tekintetében) közvetlenül megállapítható, hogy a két módszer azonos eredményt ad a disszociációs állandóra nézve. A miozin felszínre jellemző R (kötőhelyek száma) paraméter vonatkozásában is teljesen reális a háromszoros különbség, hiszen az Eu-fibrinogénnel végzett kísérletekhez háromszor töményebb miozin oldattal történt az immobilizáció mint a ^{125}I -fibrinogén esetében. Az eltérő felszíneken nyert értékek azonossága tovább erősíti a miozin-fibrinogén kölcsönhatásra kapott egyensúlyi állandó validitását.



36. ábra: Fibrin monomerek és miozin kölcsönhatása SPR alapján. [IX]

A. Fibrint immobilizáltunk a CM5 szenzor chip felszínén és miozint áramoltattunk felette 250 mM NaCl tartalmú pufferben, közben az SPR választ regisztráltuk a kétsatornás Biacore X rendszerben (a kontroll BSA felszínén kapott szignál levonásra került a relatív SPR válaszként bemutatott eredményeknél).

B. Miozint immobilizáltunk a CM5 szenzor chip felszínén és fibrin monomereket áramoltattunk felette 5 mM GPRP peptid tartalmú pufferben, és a relatív egyensúlyi SPR szignált (R_{eq}) regisztráltuk, amely alapján a $R_{eq} = \frac{[fibrin] \cdot R_{max}}{[fibrin] + K_d}$ egyenlethez történő illesztés útján (**betétábra**) meghatároztuk a miozin-fibrin kölcsönhatásra jellemző K_d értéket.

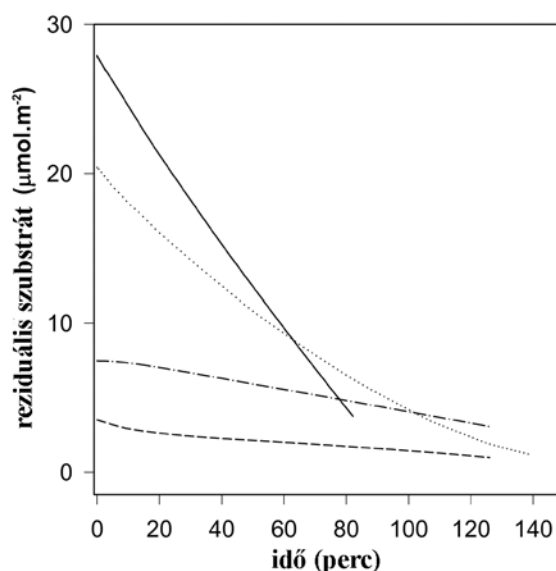
Amikor fibrin – miozin kölcsönhatásokat SPR válasz alapján értékeljük és a miozint magas ionerősségű (300 mM-nál magasabb NaCl tartalmú) pufferben áramoltatjuk a fibrin felszínén, nem lehet kötődési szignált megfigyelni. Ha 250 mM NaCl mellett vizsgáljuk az interakciót, lassan emelkedő SPR szignált lehet megfigyelni a fibrin felszínén, ami nem jelentkezik az albumin felszínén (a **36.A ábra** a két felszínén kapott szignál különbségét mutatja be). Ilyen körülmények között a disszociáció rendkívül lassú, a kikötődött miozint csak 4 M ureával tudtuk eltávolítani, ami arra utal, hogy nem egyszerű miozin – fibrin kötődésről van szó, hanem még miozin aggregációról is, vagyis a fibrin

mátrixmagként viselkedik, amely elindítja a miozin aggregációt (az albumin viszont nem). Oldatban a miozin pH és ionerősség függvényében hajlamos aggregációra [159]. Fiziológias ionerősség (0,1 – 0,15 M) és pH (7 körül) mellett a miozin önasszociációja ún. „bipoláris fragmentumok” képződésével kezdődik, amelyekben a miozin molekulák hosszú helikális farokrészei egymáshoz rendeződnek. Ezek az anti-parallel miozin dimerek képezik a nagyobb aggregátumok magját. Így a fibrin felszín ideális elindítója lehet a folyamatnak azáltal, hogy megköti, bekonzentrálja a széteső vérlemezkékből vagy más sejtekből származó miozint.

Amikor oldatban levő fibrin monomereket áramoltatunk immobilizált miozin felszínen (**36. ábra, B**), a gyenge, de gyors ligand interakciókra jellemző négyzet alakú pulzus szignálokat lehet megfigyelni [160,161]. Érdeemes megjegyezni, hogy miután ebben a kísérleti felállásban a keringő ligand aggregációja gátolt, az interakció másodpercek alatt zajlik, ami megerősíti a **36.A ábrán** megfigyelt lassú folyamat értelmezését mint aggregáció és nem egyszerűen kötődés következménye. A fibrin monomerek és miozin kölcsönhatására meghatározott egyensúlyi disszociációs állandó $0,94 \mu\text{M}$ (**36.B ábra, betét**) megközelíti a fibrinogén – miozin interakcióra megállapított értéket (vagyis a fibrinogén – fibrin átalakulás nem befolyásolja az affinitást miozin iránt), de 6-szor magasabb mint a fibrin monomerek ön-aggregációjáról közölt disszociációs állandó ($0,156 \mu\text{M}$) [162]. Így *in vivo* még miozin jelenlétében is a fibrin monomerek nagyobb affinitásuk miatt inkább fibrin polimert képeznek és nem miozint kötnek meg. Ennek megfelelően nem várható, hogy a fibrin keletkezés stádiumában a miozin módosítaná a fibrin szerkezetet, ami összhangban áll a **31. ábrán** bemutatott fibrin turbiditás azonos, miozin jelenlététől független kezdeti értékeivel. A trombus öregedése során viszont a miozin – fibrin komplex keletkezése, ill. az e körül képződő miozin aggregátumok magyarázatot adnak a **31. ábra betéjében** bemutatott tPA-indukálta fibrinolízis miozin-függésére. Amennyiben a komplexben a miozin lefedi a fibrin tPA-kofaktor funkciójáért felelős kötőhelyeket, már alacsony miozin koncentrációknál a tPA-indukálta fibrinolízis jobban gátlódik, mint az urokinázzal indított fibrinoldás, hiszen az urokináz működéséhez nem szükséges kofaktor. Ez a plazminogén aktiváció szintjén érvényesülő hatás ráakódik az előzőekben tárgyalt versengésre, amely a plazminért zajlik a fibrin és a miozin között.

A miozin – fibrin kölcsönhatásokra vonatkozó adatok ismeretében és a 4.1 fejezetben ismertetett modell elvét felhasználva szimuláltuk a miozin tartalmú fibrin oldását felszínére alkalmazott plazminnal [XVI]. A modellben figyelembe vettük, hogy ebben a rendszerben a plazmin három szubsztrátra hat (fibrin, miozin és fibrin-miozin komplex), továbbá az ismert kinetikai paramétereket fibrinre nézve (4.1 fejezet) és a

fentiekben tárgyalt egyensúlyi állandókat. A miozinra és miozin-fibrin komplexre vonatkozó ismeretlen kinetikai paramétereket maga a modellrendszer becsülte 5 különböző miozin tartalommal rendelkező fibrin 6 eltérő plazmin koncentráció hatására történő oldásának turbidimetriás követése alapján [XVI]. A szimuláció végeredményét a **37. ábra** mutatja be.



37. ábra: Fibrin-miozin alvadék oldása felszínre alkalmazott plazminnal (szimuláció).

A miozin hiányában történő fibrinoldást a folytonos vonal mutatja be. A fibrin-miozin (2,5:1 moláris arány) alvadék három plazmin szubsztrátot tartalmaz: szabad fibrin (pontosított vonal), szabad miozin (szaggatott vonal) és fibrin-miozin komplex (szaggatott és pontosított vonal), amelyek lebontását a [XVI] mellékletben leírt modell szerint becsült paraméterekkel szimuláltuk.

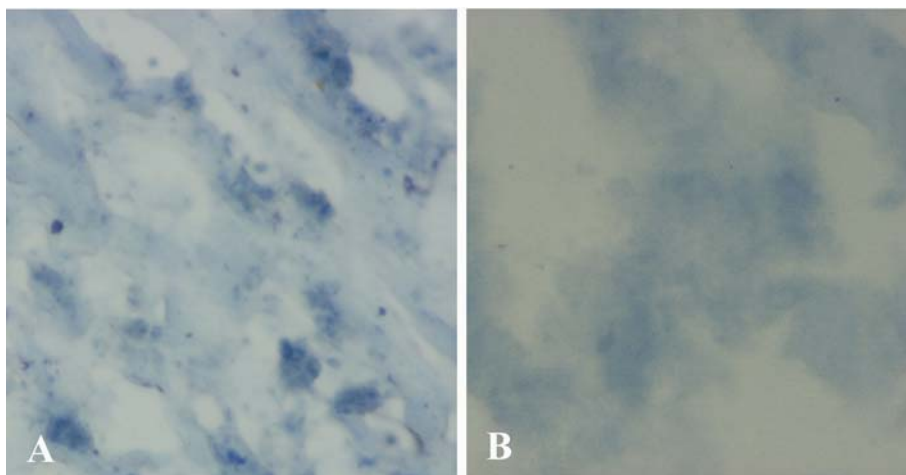
A szimuláció szerint a plazmin alkalmazását követő első 10 percben a fibrin lebontása a fibrin-miozin komplexben teljesen gátolt. Ez idő alatt leginkább a szabad miozin kerül lebontásra, a két alternatív szubsztrát jelenléte miatt pedig a szabad fibrin oldása is lassabb a miozin-mentes alvadékhoz képest. Ha figyelembe vesszük a fentiekben tárgyalt plazmin K_M értékeket ($3,2 \mu\text{M}$ miozinra, $0,14 \mu\text{M}$ fibrinre), a modell becslése szerint a miozin jelenléte mint önálló plazmin szubsztrát nem adhat elegendő magyarázatot a fibrinolízis lefolyásában kísérletekben tapasztalt lassulására. A kielégítő szimulációhoz még legalább egy kiegészítő tényezőt kell beiktatni, amely a fibrin-miozin komplex jelenlétével adott is. Amennyiben a plazmin kötődik ehhez a komplexhez, de csak lassan bontja (ahogy a **37. ábrán** szerepel), vagyis a komplex védőpajzsot képez a fibrinrostok körül, a miozin tartalmú fibrin szimulált oldása jól illeszkedik a mérési adatokhoz [XVI]. A fibrin-miozin komplexre vonatkozó közvetlen adatok hiányában azonban ezt a magyarázatot egyelőre hipotetikusnak kell tekinteni.

Összefoglalva, a miozinra vonatkozó eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a trombus szerkezetében előforduló sejteredetű komponensek alapvetően befolyásolják mind a plazminogén aktivációt mind a plazmin hatást.

4.7. Fibrinolízis lipid környezetben

4.7.1. Plazminogén aktiváció és plazmin aktivitás foszfolipidek jelenlétében

Az előző fejezet bevezető részében említett trombocita pusztulásra vonatkozó tanulmányok valószínűsítik, hogy a trombusban jelentős mennyiségű foszfolipidekkel is számolni kell, amire közvetlen adatok is utalnak [163]. Ha figyelembe vesszük a vérlemezke foszfolipid tartalmát [164] és az artériás trombusokban megfigyelt vérlemezkeszámot [154], a trombusok becsült foszfolipid koncentrációja 7,5 g/l, ami meghaladja a fibrinét. E becslés ellenőrzésére sebészileg eltávolított artériás trombust vizsgáltunk.



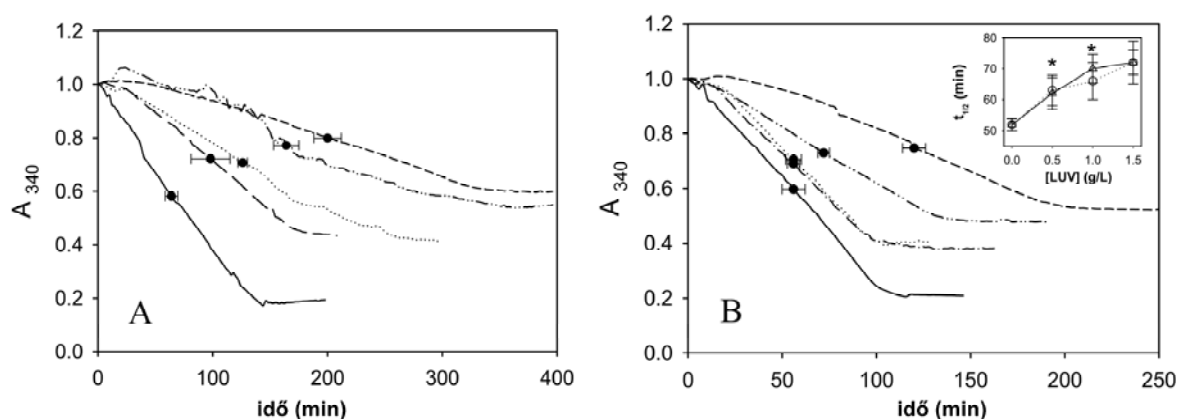
38. ábra: Artériás trombus foszfolipid tartalma. [X]

Arteria femoralis-ből eltávolított trombus (A) vagy 5 g/l foszfolipid tartalmú fibrin (B) fagyasztott metszetét foszfolipidre festettük Nílus-kékkel. Az **A** részben kékre festődő vérlemezkek csoportjai látszanak, míg a **B** részben a fibrinbe belekevert foszfolipid inhomogén kék festődése. 40× eredeti nagyítás.

A femorális artériából eltávolított trombus metszetén foszfolipidek masszív jelenléte mutatható ki Nílus-kék festéssel (**38. ábra**). A foszfolipid festés intenzitása a trombus metszeten összevethető az 5 g/l foszfolipid tartalmú fibrinével (a festési eljárással nem lehet pozitív szignált regisztrálni, amennyiben a fibrin kevesebb mint 1 g/l foszfolipidet tartalmaz). Bár ezzel a módszerrel nem tudjuk a foszfolipid forrását azonosítani, a foszfolipid-pozitív részecskék nagysága vérlemezke eredetre utal.

A vérlemezke foszfolipidnek a vérárvadás egyes lépéseiben betöltött szerepe kiterjedten tanulmányozott terület [165,166], de a fibrinolízisre gyakorolt hatásáról kevés és ráadásul ellentmondásos adat áll rendelkezésre. Így foszfolipid felszínen képzett

monomer fibrinogén rétegek fokozott plazmin érzékenységről [167], fibrinogén [168] és fibrin [169] gátolt lebontásáról is szólnak beszámolók. A fibrinolízis szabályozása tekintetében pedig csak a foszfolipid hatására fokozott tPA – PAI-1 interakció ismert [170]. Ugyanakkor egyértelmű, hogy a trombociták rezisztenssé teszik a trombusokat tPA-val szemben [171], amely részben PAI-1 tartalmukkal függ össze [172], de PAI-1-től független fibrinolízis gátlásról szóló megfigyelések is ismertek [173]. Ennek tükrében indokoltnak tűnik közelebbről megvizsgálni a trombocita membránok és különösen a fehérje-mentes foszfolipidjük hatását a fibrinolízisre.



39. ábra: Foszfolipidek hatása a tPA-indukálta fibrinolízisre. [X]

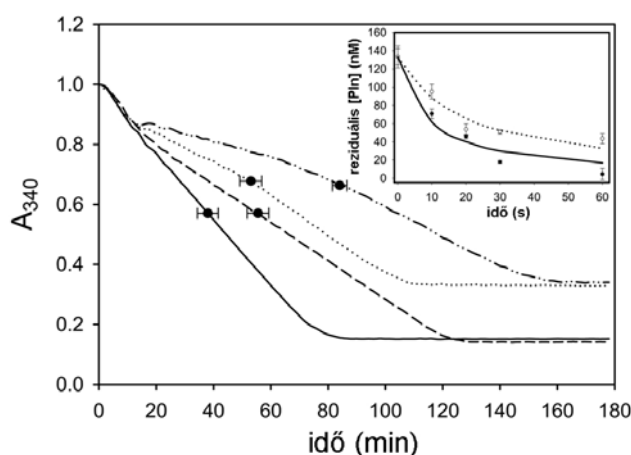
tPA (140 nM) került a plazminogén (0,25 μ M) tartalmú fibrin felszínére, amely a következő kiegészítő anyagokat is tartalmazta: semmi (folytonos vonal), trombocita homogenátum (0,5 g/l foszfolipid tartalmú, röviden szaggatott vonal), trombocita membrán foszfolipid (0,5 g/l, pontozott vonal), poPCPS (0,5 g/l, hosszan szaggatott vonal vagy 1 g/l, két ponttal szaggatott vonal), poPCPS1:1 (1 g/l, egy ponttal szaggatott vonal). Az abszorbanciát folyamatosan mértük 340 nm-nél (A_{340}) 25 °C-on (A) vagy 37 °C-on (B). A szimbólumok a lízisidőt ábrázolják. Betétábra: lízisidő eltérő foszfolipid koncentráció mellett (\circ , PCPS1:1; Δ , PC). A csillag szignifikáns ($p < 0,01$) különbséget jelöl a sorban megelőző koncentrációhoz képest.

A nyers trombocita homogenátum gátolja a tPA-indukálta fibrinolízist (39. ábra), ami összefüggésbe hozható a trombociták ismert PAI-1 tartalmával. Ezen magyarázat ellen szól, hogy azonos koncentrációjú homogenátum nem gátolja a plazminogén aktivációt tPA-val fibrin-mentes homogén rendszerben (nem ábrázolt adatok) és ugyanakkor a gátlóhatás részben reprodukálható fehérje-mentes trombocita membránból készült vezikulákkal (membrán LUV), valamint szintetikus LUV-val (poPCPS) azonos foszfolipid koncentrációk mellett és teljes mértékben reprodukálható emelt koncentrációjú LUV-val. A gátlás foka jelentősen csökken 37 °C-on (39. ábra, B). A gátlás 1 g/l foszfolipid mellett éri el maximumát (39. ábra, betét), de ha LUV helyett rövidláncú zsírsavakat tartalmazó foszfolipidet használunk (DHPS), amely nem képez membránszerkezeteket, még 4,5 g/l koncentrációnál sem lép fel gátlás ebben a kísérleti összeállításban (nem ábrázolt adatok).

Ezen a ponton érdemes kitérni a kísérleteinkben használt foszfolipidek szerkezeti jellemzőire. Amennyiben a foszfolipid két palmitinsavat tartalmaz, az általa alkotott membránszerkezet olvadási hőmérséklete (T_m , amelynél a rendezett gél fázis átalakul folyadék-kristályossá) 41 – 45 °C között van a poláros fej elektromos töltésétől függetlenül (akár foszfatidil-kolin (PC), akár foszfatidil-szerin (PS) esetében) [174]. Tehát 37 °C-on a dipalmitil foszfolipidek gél-fázisú membránt hoznak létre és ezen a hőmérsékleten a PC/PS arányt változtatva jellemezni tudjuk a poláros fej szerepét a vizsgált hatásoknál. Amennyiben a foszfolipidek zsírsav összetételét változtatjuk, módosul az általuk alkotott membrán alvadási hőmérséklete. Így a PC membrán T_m értéke 41 °C-ról (100 % dipalmitil származék esetében) 35 – 32 °C-ra csökken, ha a szerkezetbe 8 – 24 % palmitil – oleil származék épül be (poPC) [175]. Megfelelő arányú poPC/PC választásával azonos összetételű foszfolipid keverékkel 25 °C-on rendezett gél fázist hozunk létre, míg 37 °C-on folyadék-kristályost és így a membrán fázis jelentőségét tudjuk tanulmányozni. A foszfolipidek általunk alkalmazott bináris keverékei (zwitterionos/anionos, telített/telítetlen acil származékok) kétségtelenül erősen leegyszerűsített modelljei a vérlemezke membránnak, de ezekben is érvényesül a természetes membránokra jellemző, laterális irányban rendezettségi fázis szerint elkülönült domének heterogenitása [176,177]. A rendezett/rendezetlen domének határvonalában változnak a membrán funkcionális jellemzői: nő a permeabilitás [176], fokozódik a fehérjék kötődése [178], nő a kötődési entalpia változás [179]. A trombocita membránok adekvát modellezéséhez mind az elektromos töltést, mind a fluiditást meghatározó foszfolipidek arányát érdemes tág határok között változtatni, mert az ismert összetételük nagy fokú heterogenitásra utal [180]. A trombocita membránban a zwitterionos foszfolipidek dominálnak (az összes foszfolipid 83 mol%-a foszfatidil-kolin, szfingomielin, foszfatidil-etanolamin), míg az anionos foszfatidil-szerin és foszfatidil-inozitol 17 mol%-ot képviselnek. A vérlemezkek aktivációja során membránjuk dinamikus átalakulásokon megy keresztül: a belső rétegből foszfatidil-szerin helyeződik ki és kiterjedt anionos foltokat hoz létre a külső felszínen [165,166]. Bár zsírsavösszetétele alapján [180] a trombocita membrán testhőmérsékleten inkább folyadék-kristályos fázisban van, a membránfehérjék jelenléte miatt eltérő fluiditású (ezen belül gél-fázisú is) domének figyelhetők meg mind trombocita [181], mind más sejtek [182,183] membránjában. Tehát a magas PS tartalmú vagy gél-fázisú LUV-val tett megfigyeléseink a vérlemezke membrán körülírt régióhoz köthetők *in vivo*.

Ennek fényében lehet értelmezni a **39. ábrán** bemutatott eredményeket. A foszfolipid hatás membrán szerveződéshez kötött, a vízdékony DHPS nem gátolja a tPA-indukálta fibrinolízist, de a membrán rendezettsége is fontos. A rendezett gél-fázist képző

PC és PS keverékek, amelyek dipalmitil származékok és T_m értékük $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ [176], $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is gátolja a fibrinolízist. Ha viszont a kísérlet hőmérséklete messze van a membrán T_m értékétől, a gátlás teljesen elmarad, ahogy ez a **39. ábra B részében** megfigyelhető a poPCPS1:1 esetében, amelynek az 50 %-os részesezésű palmitil-oleil komponense miatt a T_m értéke $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt van [175]. A 20 %-os palmitil-oleil részesezésű poPCPS keverék, amelynek T_m értéke $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ [175], gátolja a fibrinolízist T_m közeli hőmérsékleten: erősebben a T_m gél-fázisú oldalán ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) és gyengébben a folyadék-kristályos oldalán ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Összhangban a gátlás gél-fázis követelményével és a trombocita membrán fent említett foszfolipid összetételével, a tisztított membrán foszfolipidból készült LUV csak $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on gátolja a fibrinolízist. A teljes membránból készült LUV viszont $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is gátol, ami a fehérjék jelenlétéhez kötött gél-fázisú doméneknek [174,181-183] tudható be. Az általunk leírt gél-fázis követelmény magyarázatot ad az irodalomban található bizonyos ellentmondásokra. Amikor az alveoláris fibrinlerakódások oldását vizsgálták és a tüdő surfactant hatását fő foszfolipid komponensével, dipalmitil-foszfatidilkolinnal (gél-fázis) modellezték, plazmin gátlásról számoltak be [168,169]. Amikor viszont természetes sejtmembránból izolált foszfolipidet használtak, amely bőven telítetlen zsírsavakat is tartalmaz és így folyadék-kristályos, gátlás nem lépett fel [167].



40. ábra: Foszfolipidek hatása a fibrinolízis α_2 -PI-val történő gátlására. [X]

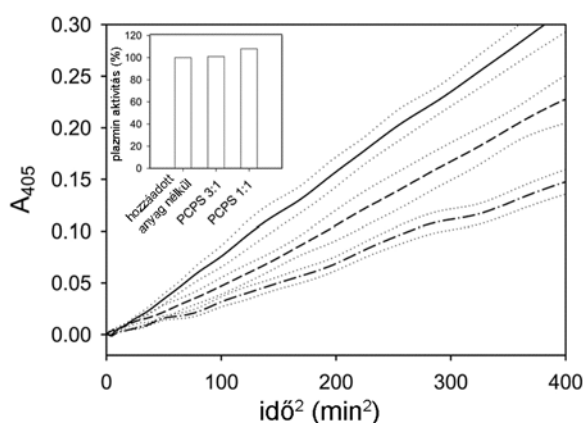
tPA (140 nM) került a plazminogén ($0,5\text{ }\mu\text{M}$) tartalmú fibrin felszínére, amely a következő kiegészítő anyagokat is tartalmazta: semmi (folytonos vonal), $0,44\text{ }\mu\text{M}$ α_2 -PI (szaggatott vonal), 1 g/l poPCPS (pontosított vonal), $0,44\text{ }\mu\text{M}$ α_2 -PI és 1 g/l poPCPS (két ponttal szaggatott vonal). Az abszorbanciát folyamatosan mértük 340 nm -nél (A_{340}) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Betét: plazmin gátlása α_2 -PI-val fibrin hiányában. Ekvimoláris (133 nM) koncentrációjú plazmint és α_2 -PI-t $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on $20\text{ }\mu\text{l}$ -es össztérfogatban pufferben (●) vagy 1 g/l poPCPS szuszpenzióban (○) összekevertük és a jelzett időpontokban $200\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ mM}$ Spectrozyme-PL hozzáadásával mértük a maradvány plazmin $[\text{Pln}]$ aktivitását. A mérési pontokhoz (szimbólumok) a
$$[\text{Pln}] = \frac{[\text{Pln}]_0}{1 + [\text{Pln}]_0 \cdot k'' \cdot t}$$

egyenletet [XXX] illesztettük (vonalak). A legjobb illesztést $0,87 \times 10^6\text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ill. $0,38 \times 10^6\text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ k'' másodrendű sebességi állandó értékekkel nyertük foszfolipid nélkül, ill. foszfolipid mellett.

A **39. ábrán** bemutatott gátló hatás jelentőségét hangsúlyozza, hogy ennek mértéke megegyezik a fibrinbe belekevert $0,44 \mu\text{M}$ $\alpha_2\text{-PI}$ hatásával (**40. ábra**), ez az $\alpha_2\text{-PI}$ koncentráció pedig magasabb mint a trombusokban mért érték [53]. Bár fibrin-mentes körülmények között a foszfolipidek enyhén lassítják a plazmin - $\alpha_2\text{-PI}$ reakciót (**40. ábra, betét**), fibrinben a foszfolipid és az $\alpha_2\text{-PI}$ gátló hatása összeadódik (**40. ábra**). Ez az eredmény arra utal, hogy a foszfolipidek legalább részben eliminálják a fibrin plazmint védő hatását az $\alpha_2\text{-PI}$ -val szemben [XXX].

Mivel a **39. ábrához** használt kísérleti összeállítás magában foglalja mind a plazminogén aktivációt, mind a plazmin enzimátikus hatását, a foszfolipid célpontjának azonosításához külön-külön is indokolt vizsgálni a két folyamatot. Ha homogén oldatban vizsgáljuk a plazminogén aktivációt (**41. ábra, betét**), vagy Spectrozyme-PL-n mérjük plazmin aktivitását (nem ábrázolt adatok), LUV jelenléte ($1,5 \text{ g/l}$ koncentrációig) nem befolyásolja a reakciók sebességét. Ha viszont a LUV-kat belekeverjük fibrinbe plazminogénnel együtt és a plazmin a felszínre kerülő tPA hatására keletkezik, a plazminogén aktiváció jelentősen lelassul (**41. ábra**).

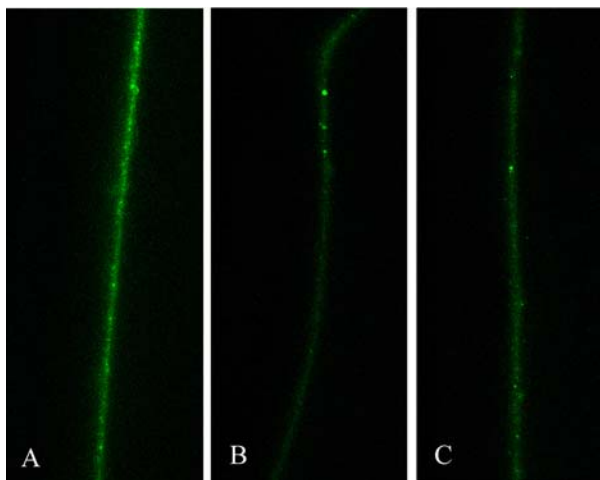


41. ábra: Plazminogén aktiváció tPA-val foszfolipidek jelenlétében. [X]

A tPA Spectrozyme-PL-lel együtt került az átlátszó fibrin alvadék felszínére, amely plazminogént és a következő hozzáadott anyagokat tartalmazta: semmi (folytonos vonal), 1 g/l PCPS3:1 (szaggatott vonal), 1 g/l PCPS1:1 (ponttal szaggatott vonal). Az abszorbanciát folyamatosan mértük 405 nm -nél (A_{405} , a pontozott vonalak a mérések szórását ábrázolják). Betét: plazminogén aktiváció tPA-val homogén oldatban fibrin nélkül. A tPA hozzáadását követő 4. percben keletkezett plazmin Spectrozyme-PL-en mért aktivitását ábrázoltuk (100 % a foszfolipid nélkül történő aktiváció során mért plazmin aktivitás, a LUV koncentráció 1 g/l mindkét esetben).

A **41. ábra** kiemeli a megfelelő módszertani megközelítés fontosságát, annak jelentőségét, hogy az *in vivo* környezetet jobban modellező rendszereket kell alkalmazni a fibrinolízis vizsgálatánál. Amennyiben a plazminogén aktivációt csak a hagyományos módszerrel vizsgáltuk volna (**betét**), a foszfolipid hatás rejtve maradt volna. Az újonnan bevezetett fibrin-függő méréssel viszont egyértelművé válik, hogy a foszfolipidek gátolják a plazminogén aktivációt, ha az a trombolízishez hasonlóan fibrin felszínén történik. A

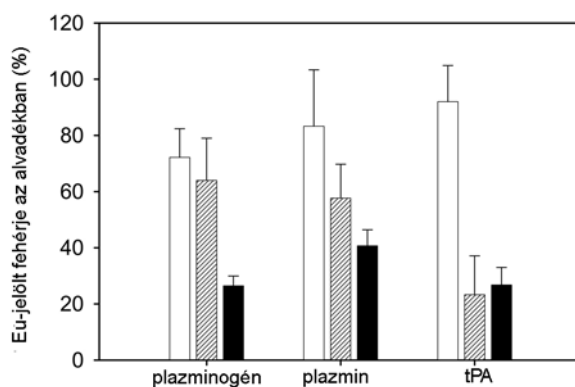
gátlás foka korrelál a LUV anionos foszfolipid tartalmával, de a negatív elektromos töltés nem az egyedüli szerkezeti feltétele a hatásnak: amennyiben a fibrinbe az anionos, de vízóldékony DHPS-t keverjük be, a plazminogén aktiváció gátlása elmarad (nem ábrázolt adatok). Tehát a foszfolipid hatáshoz lényeges a membránszerkezet képződése is.



42. ábra: FITC-tPA penetrációja foszfolipid tartalmú fibrinbe. [X]

FITC-tPA-t (12 nM) alkalmaztunk olyan fibrin felszínére, amely nem tartalmazott foszfolipidet (A), 1g/l PCPS1:1 (B) vagy 1 g/l PCPS3:1 LUV-t tartalmazott. A folyadék-gél határzónát konfokális mikroszkóppal tartottuk megfigyelés alatt. A bemutatott felvételeken a határréteget lehet látni (zöld sáv), amelyben a FITC-tPA feldúsult 30 perccel alkalmazása után.

Ha a FITC-tPA fibrinbe történő penetrációját követjük konfokális mikroszkóppal (42. ábra), a sorozatos felvételek igazolják, hogy 30 percen belül egy állandó mélységű határréteg alakul ki, amelyben a tPA feldúsul. Amikor 1 g/l PCPS1:1 van jelen a fibrinben, e reaktív réteg végső mérete szignifikánsan csökken a foszfolipid-mentes fibrinhez képest ($30,84 \pm 2,98 \mu\text{m}$ helyett $21,53 \pm 2,05 \mu\text{m}$, $p < 0,001$). A PCPS3:1 (1 g/l) viszont nem befolyásolja a reaktív réteg vastagságát ($29,44 \pm 1,42 \mu\text{m}$). Amennyiben FITC-plazmint rétegezzünk rá a fibrin felszínre, mind a PCPS1:1, mind a PCPS3:1 csökkenti a határréteg méretét $74,56 \pm 9,19 \mu\text{m}$ -ről $34,28 \pm 6,25 \mu\text{m}$ -re, ill. $39,76 \pm 4,28 \mu\text{m}$ -re. Bár a tPA vagy plazmin által elfoglalt zóna mérete fontos meghatározója a fibrinolitikus hatékonyságnak, a folyamat sebessége még a reaktív határrétegben levő enzimek koncentrációjától is függ. A fibrinbe diffundáló tPA és plazmin mennyiségi meghatározása (43. ábra) azt mutatja, hogy a foszfolipidek nagyobb mértékben korlátozzák a fibrinbe penetráló enzimek mennyiségét mint az általuk elfoglalt zóna méretét és ez a hatás határozott összefüggésben áll poláros fejük anionos töltésével. Ami a plazminogént illeti, annak penetrációját csak az 50 %-ban anionos foszfolipid tartalmú LUV befolyásolja. A penetráció időlefolyása minden vizsgált fehérjére nézve hasonló: 40 perc alatt a retenció eléri maximális fokát (nem ábrázolt adatok).

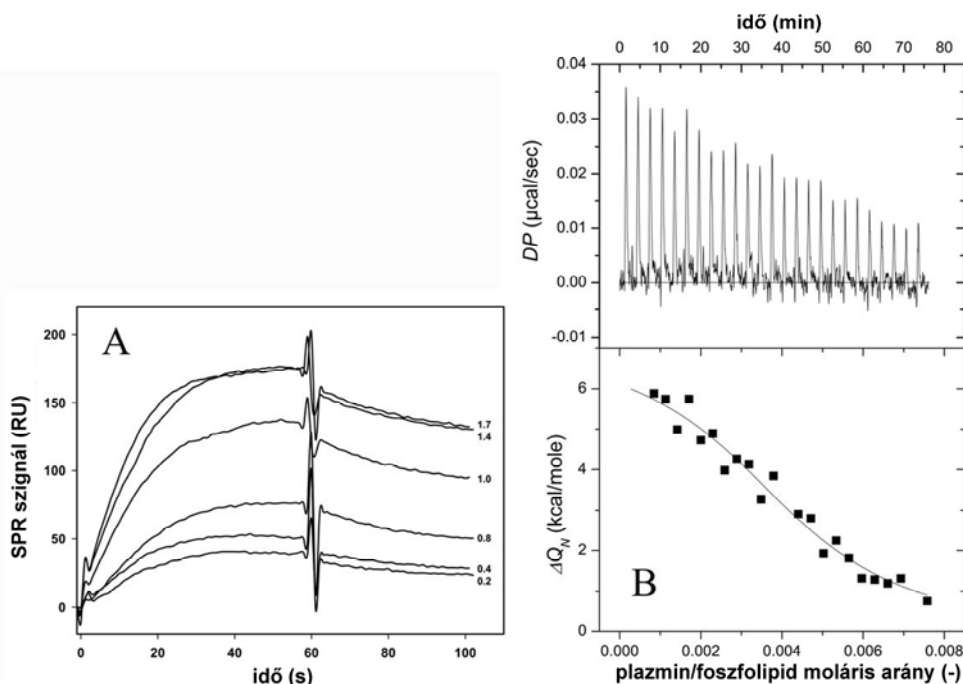


43. ábra: Eu-jelölt fehérjék penetrációja foszfolipid tartalmú fibrinbe. [X]

PC (üres oszlop), PCPS3:1 (besatírozott oszlop) vagy PCPS1:1 (fekete oszlop) be volt keverve fibrinbe (1 g/l foszfolipid koncentrációban) és ennek felszínére Eu-plazminogént, Eu-plazmint vagy Eu-tPA-t rétegeztünk rá. 40 perc elteltével a folyadék réteget eltávolítottuk és rövid mosás után a fibrinben megmaradt Eu-fluoreszcencia szignált mértük (100 % a foszfolipid-mentes fibrinben megmaradó fehérjemennyiség).

Ha 1 pmol Eu-plazminogént, Eu-plazmint vagy Eu-tPA-t alkalmazunk fibrin monomerekkel bevont felszínre, 10 perces inkubációt és mosást követően 146, 324 illetve 212 fmol kötődött fehérjét lehet detektálni. Ha emelkedő koncentráció PCPS1:1 mellett alkalmazzuk a fehérjéket, egyre kisebb részük kötődik a fibrinhez (0,5 g/l foszfolipid mellett már csak 9, 42 illetve 31 fmol). Hasonló tendencia érvényesül BSA-val bevont felszínen is, ahol a PCPS1:1 csökkent a BSA-hoz kötött ligand mennyiségét 41 fmol Eu-plazminogén, 52 fmol Eu-plazmin és 45 fmol Eu-tPA értékekről 4, 3 illetve 3 fmol-ra. A két különböző fehérjével bevont felszínen kifejtett hasonló versengő hatások arra utalnak, hogy a foszfolipid inkább az oldatban levő ligandokkal és nem a felszínhez immobilizált fibrinnel lép kölcsönhatásba. Ennek tisztázására közvetlen kötődési vizsgálatokat végeztünk.

Az egyik kísérleti megközelítésünk a fehérje-foszfolipid elegyek centrifugálásán alapul. Ha LUV-t $10^5 \times g$ gyorsulással centrifugálunk, teljesen foszfolipid-mentes felülúszót tudunk nyerni. Amennyiben azonos körülmények között fehérje-LUV elegyet centrifugálunk, a felülúszó fehérjetartalma tükrözi a szabad (LUV-hoz nem kötődött) fehérje arányát, hiszen a szabad LUV-t és a LUV-fehérje komplexeket leüleptítjük. Így a PCPS3:1 a plazmin 56 %-át távolítja el a felülúszó frakcióból, a PCPS1:1 pedig 86 %-át. Mindkét foszfolipid a plazminogén megközelítőleg 30 %-át távolítja el a felülúszóból. Ezt a típusú értékelést nem tudtuk elvégezni tPA esetében, mivel a tPA foszfolipid hiányában is jelentős mértékben leüllekszik és e háttér mellett nem tudunk megbízhatóan értékelhető adatokhoz jutni.



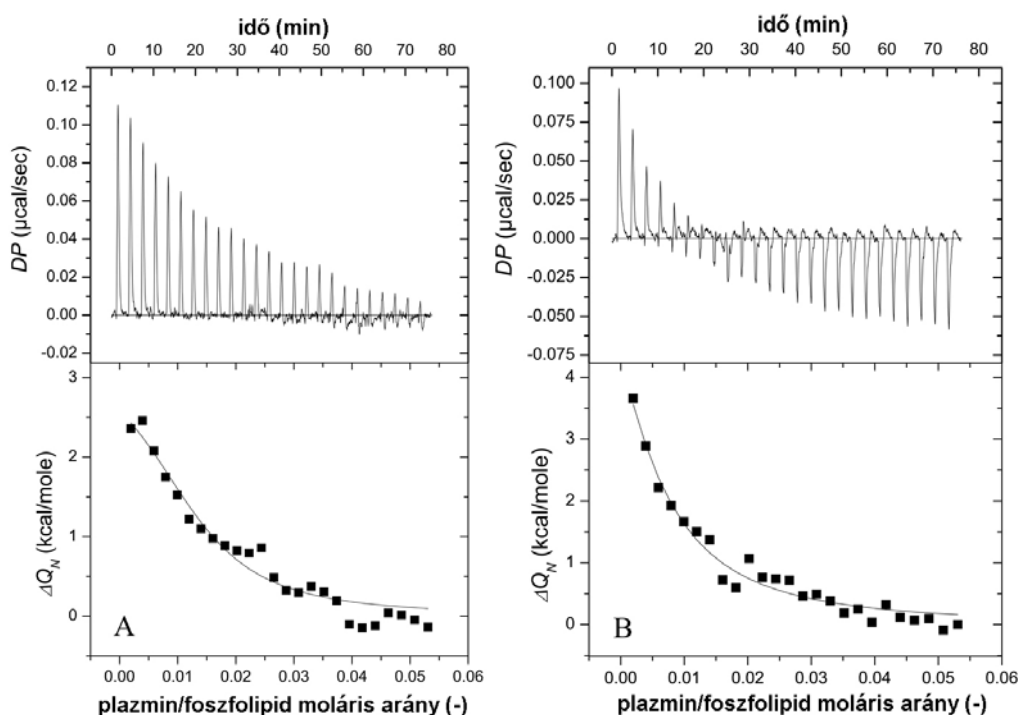
44. ábra: PCPS1:1 és plazmin kölcsönhatása. [X]

A. PCPS1:1 és PC LUV-t immobilizáltunk L1 szenzor chip Fc1 ill. Fc2 felszínén és plazmint áramoltattunk 40 μl/min felettük, közben az SPR szignált regisztráltuk. A két felszínen mért szignál különbségét ábrázoltuk. A plazmin koncentrációját (μM-ban) a görbék melletti számok jelzik.

B. PCPS1:1 és plazmin közötti kölcsönhatás ITC-ben vizsgálva. 0,5 mM PCPS1:1 LUV-hoz 25×10 μl 0.02 mM plazmint injektáltunk 25 °C-on, a kaloriméter a hőmennyiség változást detektálta. Az ábra felső részén a nyers hőmennyiség változást ábrázoltuk (DP), az alsó részen pedig az abból számított (alapvonal korrekcióval, a csúcsok integrálásával, és a koncentrációk normalizálásával nyert) entalpia változást (ΔQ_N), amelyet az egy-kötőhelyes algoritmus szerint értékeltünk [110]. A görbe a kísérleti pontokhoz történő legjobb illesztés, amely a **8. táblázatban** feltüntetett paramétereket eredményezi.

A foszfolipidek és a fibrinolitikus rendszer egyes tagjai közötti kölcsönhatások erősségét két technikával értékeltük (SPR és mikrokolorimetria). Az SPR kísérletekhez két eltérő szenzor chipet használtunk: az L1 chip rövid dextrán láncaihoz vezikuláris formában kötődik ki a foszfolipid, míg a HPA chip felszínén a vezikulák szétterülnek és a foszfolipid egy rétegben bevonja azt. Az SPR szignál szerint a PCPS1:1 mindkét formája (az egyrétegű és a vezikuláris) megköti a plazmint 80.32 ± 15.86 nM illetve 312 ± 56.20 nM egyensúlyi disszociációs állandóval (K_d) (**44. ábra, A**). Ezek az adatok összhangban vannak az ITC alapján összevethető körülmények mellett (vezikuláris forma, 25 °C) nyert paraméterekkel (**44. B ábra, 8. táblázat**). Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a foszfolipid egyrétegű formája jobb kötőfelszínt biztosít a plazmin számára. A PCPS3:1 keverékre vonatkozó adatok is hasonló következtetésre engednek. A plazmin csak a PCPS3:1 egyrétegű formájához kötődik az SPR válasz alapján $41,03 \pm 23.53$ nM K_d -vel, míg a mikrokolorimetriás értékelés a vezikuláris formához is mutat kötődést (**45. ábra**), de egy nagyságrenddel magasabb K_d -vel mint a PCPS1:1-hez (**8. táblázat**). A

mikrokalorimetriás titrálás nagyobb érzékenysége olyan kölcsönhatások detektálását is lehetővé teszi, amelyek csak közvetlenül a chiphez rögzülő foszfolipid monolayeren adnak értékelhető SPR szignált. A tPA-ra és plazminogénre vonatkozó adatok is alátámasztják ezt az értelmezést. A tPA csak az egyrétegű PCPS1:1-en ad SPR választ ($K_d=27,39 \pm 7,89$ nM), míg az ITC szerint a vezikuláris PCPS1:1-hez a K_d $0,62 \pm 0,14$ μ M, míg a PCPS3:1-hez a K_d $7,64 \pm 1,64$ μ M. A plazminogén nem ad telíthető SPR szignált egyik foszfolipid felszínen sem, de a mikrokalorimetria gyenge kölcsönhatásokat mutat ki: K_d $74,9 \pm 16,8$ μ M PCPS1:1 esetében és $117,1 \pm 14,2$ μ M PCPS3:1 esetében. A két módszer (SPR és ITC) csak a legmagasabb affinitású kölcsönhatásnál (plazmin és PCPS1:1) ad azonos eredményt. Az eltéréseket az SPR-technikánál alkalmazott immobilizáció különbségeivel lehet magyarázni. Az L1 chipen az 50 nm átmérőjű vezikulák dextránláncok közbeiktatásával rögzülnek a felszínhez és így az a réteg, ahol kötődés történik relatíve messze van a detektor felszíntől. A HPA chip esetében a foszfolipid monolayer közvetlenül a detektor felszínen fekszik, ami már gyengébb kölcsönhatás érzékelését is lehetővé teszi, de a megváltozott felszíni geometria miatt, a kötődési paraméterek eltérnek.



45. ábra: Plazmin és PCPS3:1 kölcsönhatása. [X]

A méréseket a **44.B ábránál** leírtak szerint végeztük 0,5 mM PCPS3:1 foszfolipiddel a mikrokaloriméter cellájában és 0,14 mM plazmin a fecskendőben 25 °C-on (A) vagy 37 °C-on (B). Az utolsó DP csúcsok a **B** részben megegyeznek a hígulási csúcsokkal, amelyeket 0,14 mM plazmin pufferbe történő befecskendezésénél lehet megfigyelni 37 °C-on.

8. táblázat: Plazmin és foszfolipidek kölcsönhatásaira jellemző kötődési és termodinamikai paraméterek. [X]

A paramétereket a **44.** és **45. ábránál** leírtak szerint határoztuk meg. Az ITC adatfeldolgozó szoftvere az asszociációs egyensúlyi állandót (K_a), a cellában levő anyag molekulánkénti kötőhelyek számát (N), az entalpia (ΔH) és az entrópia (ΔS) változást határozza meg és az ezekre jellemző statisztikai variabilitást. Mivel kísérleteinkben fehérjék kötődnek foszfolipid molekulák által alkotott csoportokhoz, az N reciprokl értéke informatívabb és fizikai jelentése is van (az a foszfolipid molekulaszám, amely egy fehérje-kötőhelyet alkot). Összehasonlítás céljából (SPR eredmények, irodalmi adatok) a táblázatban a disszociációs állandót ($K_d=1/K_a$) közöljük a K_a helyett. A két reciprokl érték standard devianciáját (SD) az N és K_a paraméterek az ITC szoftver által megadott SD értéke alapján határoztuk meg bootstrap szimulációval normális eloszlást feltételezve.

Paraméter	Foszfolipid			
	PCPS1:1		PCPS3:1	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
K_d (μ M)	0.35 ± 0.08	0.57 ± 0.14	2.45 ± 0.50	5.50 ± 1.20
$1/N$ (-)	229.4 ± 10.6	224.2 ± 18.0	78.6 ± 9.4	234.6 ± 14.0
ΔH (kcal/mol)	7.03 ± 0.5	4.85 ± 0.69	3.42 ± 0.54	13.48 ± 9.09
ΔS (cal/K.mol)	53.1	44.2	37.2	67.6

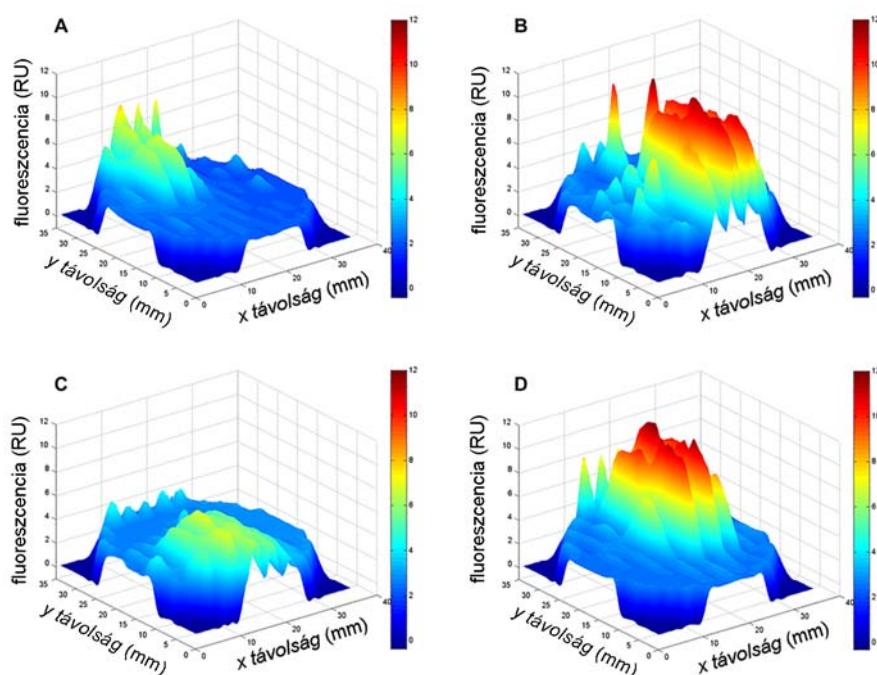
A kalorimetriás mérések entalpia adatai termodinamikai magyarázatot szolgáltatnak arra az előzőekben tárgyalt feltételre, hogy a foszfolipid hatások a fibrinolízisre csak gél-fázisú membrán szerkezeteknél érvényesülnek. A **44.** és **45. ábra** adatai szerint a LUV és a vizsgált fehérjék közötti kölcsönhatások endoterm, tehát termodinamikailag csak akkor spontán lefolyásúak, ha közben az entrópia növekszik (**8. táblázat**). Az entrópia-növekedés talán abból adódik, hogy a fehérje kötődése megbontja a LUV rendezett gél-szerkezetét. Amennyiben viszont a foszfolipid már eleve rendezetlen folyadék-kristályos állapotban van, a kölcsönhatás lehetősége termodinamikailag korlátozott (a poPCPS hőmérséklet-függő hatásai a fibrinolízisre teljes összhangban állnak egy ilyen értelmezéssel).

Összefoglalva a foszfolipiddel végzett kísérleteinket, két szerkezeti feltételt azonosítottunk, amelyhez a fibrinolízist gátló hatásuk köthető: anionos poláros fej és alvadási ponthoz közeli membrán állapot. A membrán képződés követelménye felveti annak lehetőségét, hogy a foszfolipidek kitöltik a fibrin-gél pórusait és így akadályozzák az exogén fehérjék penetrációját. Ugyanakkor közvetlenül kimutattuk, hogy a foszfolipidek nemcsak diffúziós gátat képeznek, hanem meg is kötik a fibrinolízisben szereplő egyes enzimeket. Mivel egy adott hőmérsékleten a gél-fázis képződése a telített zsírsavak arányától függ a membránokban, az ilyen rendezett domének előfordulása lehet egy kiegészítő tényező, ami hozzájárul a telítetlen zsírsavak kedvező hatásához az atherothrombosis patogenezisében. A nagyobb fluiditású membránok csökkent anti-

fibrinolitikus potenciálja ellensúlyozhatja a protrombináz komplex kialakulásában betöltött kedvező szerepüket, amelyekre régebben figyeltek fel [184].

4.7.2. Fibrinolízis szabad zsírsavak jelenlétében

Bár nyugalmi állapotban a trombociták csak nyomokban tartalmaznak szabad zsírsavakat [185], stimulusok hatására a szekréciós granulumokban levő foszfolipáz A_2 (PLA_2) felszabadul és aktiválódik [186-188]. Így a PLA_2 hidrolizálja a foszfolipidek *sn*-2 pozícióban levő észterkötését, ami szabad zsírsavak és lizofoszfolipidek felszabadulásával jár. Ha figyelembe vesszük, hogy az előző fejezetben ismertetett adatok szerint az artériás trombusokban millimoláris nagyságrendű foszfolipid koncentrációval lehet számolni, hipotetikusan a trombusokban bezárt sejtes elemekből (trombociták, leukociták) származó PLA_2 hasonló nagyságrendű szabad zsírsavat szabadíthat fel (főleg olajsavat, mert az eseteke 54 %-ában ez foglalja el a vérlemezke foszfolipid *sn*-2 pozícióját [185]). E hipotézis ellenőrzésére vizsgáltuk sebészileg eltávolított trombusok szabad zsírsav tartalmát (46. ábra).



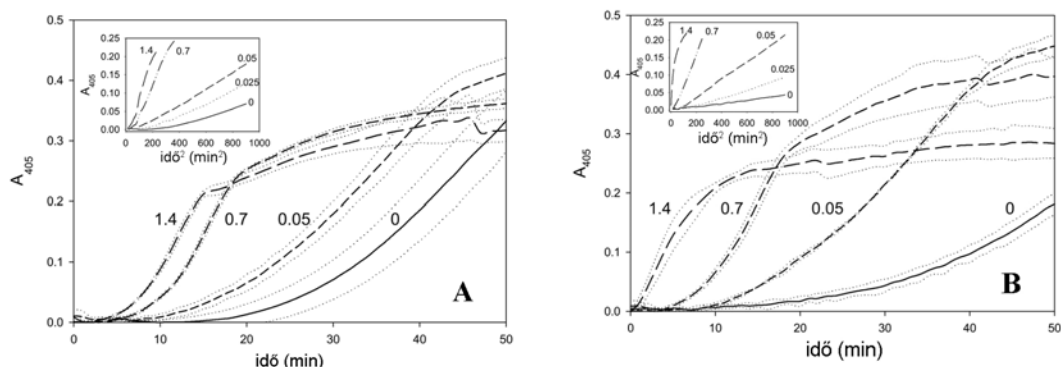
46. ábra: Szabad zsírsavak jelenléte trombusokban. [XVII]

Trombusok fagyasztott metszeit $2\ \mu\text{M}$ ADIFAB-bal kezeltük és a fluoreszcenciát (excitáció 390 nm, emisszió 460 nm) a metszet $x \times y$ méretű területén 400 pontban mértük. Az **A** és **B** rész magas, illetve alacsony szabad zsírsav tartalmú metszet fluoreszcenciáját mutatja be. A **C** rész azonos mennyiségű ADIFAB fluoreszcenciáját ábrázolja $20\ \mu\text{M}$ Na-oleát jelenlétében, míg a **D** rész az ADIFAB eredeti fluoreszcenciáját zsírsav-mentes környezetben.

A szabad zsírsavat detektáló fluoreszcens indikátor ADIFAB egészen eltérő mennyiségű szabad zsírsavak jelenlétét mutatja ki a sebészileg eltávolított trombusokban (46. ábra). A vizsgált 8 trombus közül 5 esetben a metszetben levő szabad zsírsavak teljesen kioltották az ADIFAB fluoreszcenciáját (46. ábra, A), amely hatás egyenértékű azonos térfogatú ADIFAB-hoz hozzáadott 20 μ M Na-oleáttal (46. ábra, C). Az ADIFAB eredeti fluoreszcenciája (46. ábra, D) azonban nem változott 3 vizsgált trombus metszetén (46. ábra, B). Így a trombuson belül a szabad zsírsavak koncentrációja tág határok között mozog: a kimutathatóság határa alatti értékektől kezdve egészen több száz mikromoláris értékig (1 μ l térfogatnyi trombus metszetek telítik a 0,2 nmol ADIFAB-t). Ez a megállapításunk mellett, hogy megalapozza az alábbiakban ismertetésre kerülő vizsgálatainkat, új fénybe helyezi az olajsavnak más proteázokra (PMN-elasztáz, zselatináz A és B) gyakorolt hatásairól tett korábbi megfigyeléseket [189,190]: a szabad zsírsavak hatása már nemcsak elméleti jelentőségű, hanem *in vivo* modulátor is lehet a trombusban zajló gyulladásos reakciókban.

A zsírsavak fibrinolízisre gyakorolt hatását néhány *in vitro* rendszerben vizsgáltuk. A 39. ábrán bemutatott kísérleti összeállítást úgy módosítottuk, hogy PLA₂-t is belekevertünk a fibrinbe olyan koncentrációban, amely 2 μ M/min zsírsavat szabadít fel a mérésben használt LUV-ról. Ha a fibrinben poPCPS van jelen, amelynek a T_m értéke 33 °C és így 37 °C-on alig befolyásolja a fibrinolízis lefolyását, a PLA₂ hozzáadásával el tudjuk különíteni a termékek (lizofoszfolipid és szabad zsírsav) megjelenéséhez köthető következményeket a szubsztrát (foszfolipid) eltűnése miatt fellépő gátlás-mérsékléstől. A PLA₂ mellett a poPCPS tartalmú fibrin tPA-val indított oldása szignifikánsan felgyorsul, amikor az alvadékban a szabad zsírsav koncentrációja ADIFAB-al igazoltan 0,24 mM fölé emelkedik. Amennyiben a fibrin eleve lizofoszfolipidből készült LUV-t tartalmaz, a tPA-indukálta fibrinolízis lefolyása nem tér el a foszfolipid-mentes fibrin oldásától. Ezért a további vizsgálatokat a szabad zsírsavakra korlátoztuk. Figyelembe véve a trombocita foszfolipidek olajsav tartalmát [185] és azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint elsősorban a legalább 16 C-atomú telítetlen zsírsavak befolyásolják a plazmin és más proteázok hatását [189-192], vizsgálatainkhoz az olajsavat választottuk modell molekulának.

Amennyiben a plazminogén aktivációt szelektíven vizsgáljuk a folyadék-fázis (amely az aktivátort tartalmazza) és a fibrin (amely a plazminogént tartalmazza) határfelületén (47. ábra), az olajsav jelentősen felgyorsítja a plazmin képződését. A tPA-katalizálta aktivációban a reakciósebesség 10-szeresére nő a trombusokra releváns olajsav koncentrációk mellett (9. táblázat).



47. ábra: Olajsav hatása a plazminogén aktivációra fibrin jelenlétében. [XVII]

Plazminogén tartalmú átlátszó fibrin felszínére 0,7 nM tPA-t (**A**) vagy reteplázt (**B**) rétegeztünk rá Spectrozyme-PL-lel együtt olajsav jelenlétében (a vonalak mellett levő számok az olajsav koncentrációját jelölik mM-ban). Az abszorbanciát (A_{405}) folyamatosan mértük. A pontozott vonalak az átlag körüli szórást (SD) jelölik. **Betétábrák:** a főábrán levő adatok másodlagos ábrázolása (A_{405} az idő-négyzet függvényében), ahol az egyenes szakaszok meredeksége egyenesen arányos a plazmin aktiváció sebességével [102].

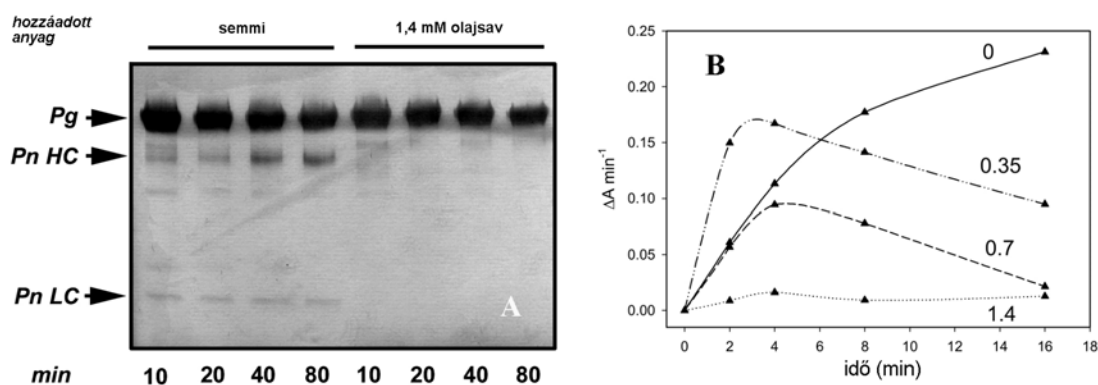
9. táblázat: Plazminogén aktiváció relatív hatékonysága fibrin felszínen olajsav jelenlétében. [XVII]

A plazminogén aktiváció relatív sebességét a **47. ábra betéteiben** szereplő lineáris ábrázolások alapján határoztuk meg: az adott aktivátorral olajsav nélkül mért meredekségre vonatkoztatjuk az olajsav jelenlétében mért meredekséget (az SD-t két mért változó arányára alkalmazott bootstrap szimulációval adjuk meg). A két alapreakció (olajsav nélkül) sebességének aránya $0,54 \pm 0,11$ (retepláz/tPA).

[olajsav] mM	plazminogén aktiváció sebessége (átlag \pm SD)	
	tPA	retepláz
0	$1,00 \pm 0,22$	$1,00 \pm 0,17$
0,025	$1,29 \pm 0,21$	$1,78 \pm 0,25$
0,05	$1,81 \pm 0,29$	$4,18 \pm 0,54$
0,7	$7,37 \pm 1,24$	$14,54 \pm 2,09$
1,4	$10,19 \pm 1,93$	$35,78 \pm 4,66$

A retepláz egy olyan rekombináns tPA származék, amely csak a 2. kringle és a proteáz domént tartalmazza. Ennek fényében az olajsav hatása a retepláz-katalizálta plazminogén aktivációra egyfelől arra utal, hogy a hatás érvényesüléséhez nincs szükség a tPA hiányzó doménjeire (fibronektin finger, EGF, 1. kringle). Másfelől mivel 2. kringle elsősorban olyan lizin oldalláncokhoz kötődik, amelyek plazmin-emésztést követően válnak hozzáférhetővé a fibrinben [56], a retepláz-katalizálta aktiváció erőteljesebb stimulációja amellettszól, hogy az olajsav jelenléte kedvez a hármas plazminogén-fibrin-aktivátor komplex kialakulásának. A fibrin jelenléte alapvetően fontos az olajsav stimulációhoz, hiszen kofaktor nélkül a plazminogén aktiváció teljesen elmarad (**48. ábra,**

A) vagy csak átmenetileg jelenik meg plazmin aktivitás oldékony kofaktor jelenlétében (48. ábra, B).



48. ábra: Olajsav hatása a plazminogén aktivációra oldatban. [XVII]

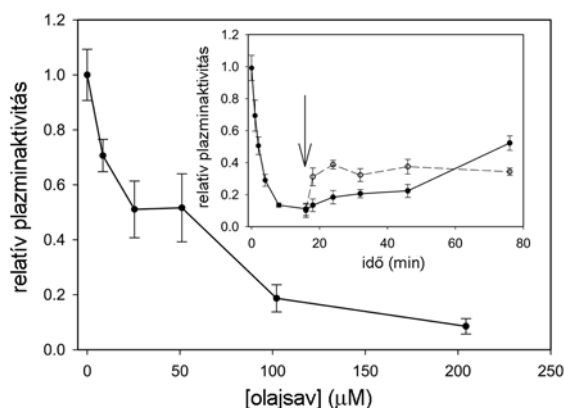
A. A plazminogén (1 μ M) aktivációt 7 nM tPA-val indítottuk és a jelzett időpontokban vett mintákban SDS és β -merkaptotanol kezelés után 10-15 %-os poliakrilamid gélen elektroforézissel szétválasztottuk az aktivációs termékeket. Rövidítések: Pg, plazminogén; Pn HC, plazmin nehéz lánc; Pn LC, plazmin könnyű lánc.

B. Az aktivációs elegy 3 μ M plazminogént, 100 μ g/ml CNBr-hasított fibrinogén peptideket és 70 nM tPA-t tartalmazott. A jelzett időpontokban vett minták plazmin aktivitását Spectrozyme-PL-en mértük és abszorbancia változásként fejeztük ki (ΔA). A vonalak mellett levő számok az olajsav koncentrációját (mM-ban) jelzik az aktivációs elegyben.

Oldatban az olajsav a tPA amidolitikus aktivitását is gátolja szintetikus peptid szubsztráton (Spectrozyme-tPA) (nem ábrázolt adatok), ami összhangban áll a tPA-katalizálta plazminogén aktiváció gátlásával fibrin hiányában (48.A ábra). A fibrinogén CNBr-hasítása hozzáférhetővé teszi a tPA és plazminogén kötőhelyeket, ami következtében a termékpeptidek (FgDP) kofaktorrá válnak a plazminogén aktivációban [145]. A 48.B ábra tanúsága szerint a FgDP-k részben kivédik az olajsav gátló hatását a szabad tPA-ra. Tehát a 47. és 48. ábra alapján az a következtetés vonható le, hogy olajsav jelenlétében a kofaktor (fibrin) funkció felerősödik és a kofaktorhoz kötött tPA védve van a folyadék fázisban érvényesülő gátló hatásokkal szemben. Ez az értelmezés egybevág azzal a megfigyelésünkkel, hogy az olajsav nem serkenti az urokináz-katalizálta plazminogén aktivációt, ami nem igényel kofaktort (nem ábrázolt adatok). Így a trombusok olajsav tartalma hozzájárulhat egyes plazminogén aktivátorok fibrin-specifitásához és a leírt hatások magyarázatot adhatnak bizonyos klinikai tapasztalatokra. Pl. finger domén hiányában a retepláz affinitása a natív fibrin iránt alacsonyabb mint a tPA-é, de ennek ellenére akár kisebb dózissal is gyorsabb terápiás trombolízist eredményez, amit eddig a hosszabb életidejével hoztak összefüggésbe [64], de az olajsav tartalmú fibrinben történő gyorsabb plazminogén aktiváció (47. ábra) is része lehet a kedvező klinikai tapasztalatnak.

A plazmin aktivitás csökkenése, illetve teljes eltűnése a 48.B ábra kísérleti összeállításában valamint a fibrin-függő plazminogén aktiváció késői stádiumában (47.

ábra) szükségessé teszi a plazmin-aktivitásra közvetlenül gyakorolt olajsav-hatás vizsgálatát.

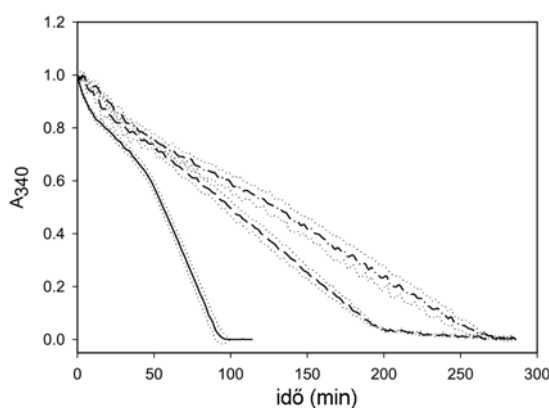


49. ábra: Plazmin amidolitikus aktivitásának gátlása olajsavval. [XVII]

Plazmint (25 nM) 15 percig olajsavval inkubáltunk és ezt követően Spectrozyme-PL szubsztráton mértük aktivitását (olajsav nélkül mért aktivitásra vonatkoztatott relatív egységben).

Betét: plazmin gátlása olajsavval az idő függvényében. A plazmint 100 μM olajsavval inkubáltuk és a jelzett időpontokban mértük az aktivitását. A nyíllal jelölt időpontban 140 μM BSA-t adtunk hozzá (folytonos vonal) vagy 5-szörösére kihígítottuk a reakcióelegyet (szaggatott vonal) és a plazmin aktivitást tovább követtük.

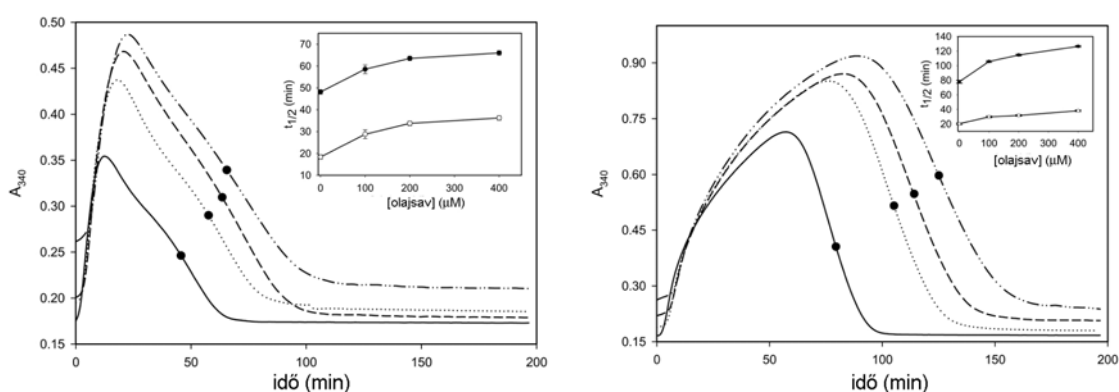
A trombusokban detektált koncentrációk mellett az olajsav határozottan gátolja a plazmin amidolitikus aktivitását (**49. ábra**). A plazmin gátlás visszafordítható BSA-val, amely megköti a szabad zsírsavakat, vagy a plazmin-olajsav elegy hígításával (**49. ábra, betét**). Hasonló, de gyengébb hatásokat figyeltünk meg arachidonsavval (nem ábrázolt adatok). Az olajsav viszont kevésbé befolyásolja a plazmin fibrinolitikus aktivitását (**50. ábra**).



50. ábra: Plazmin fibrinolitikus aktivitásának gátlása olajsavval. [XVII]

A plazminogén-mentes fibrin felszínére 10 μM plazmint rétegeztünk rá hozzáadott olajsav nélkül (folytonos vonal), 0,35 mM (szaggatott vonal) vagy 1,4 mM (pontosított és szaggatott vonal) olajsavval együtt és az alvadék turbiditását követtük (A_{340}). A pontosított vonalak a mérések szórását (SD) ábrázolják az átlag körül.

A plazminogén aktivációra és plazmin aktivitásra gyakorolt olajsav-hatásokat egy komplex kísérleti összeállításban is vizsgáltuk, amely lehetővé teszi a fibrinogén és fibrin lebontásában jelentkező következmények elkülönítését. Amikor a fibrinogén alvasztását és a plazminogén aktivációt egyszerre indítjuk (**51. ábra**), a turbiditási görbék felszálló ágában a plazminogén aktiváció folyadék fázisban, fibrinogén környezetben történik, ahol a plazmin érzékeny az olajsav-gátlásra. Így az emelkedő olajsav koncentrációk jobb fibrinogén védelmet jelentenek a plazminnal szemben, aminek magasabb turbiditás a következménye (az olajsav önmagában, plazmin keletkezése nélkül nem befolyásolja az alvadék turbiditását). A görbék leszálló ágában, amikor a fibrinogén zöme már átalakult fibrinné, az olajsav alig hat az oldás sebességére (a maximális A_{340} -t követő lízisidő a **51. ábra betéteiben**). Az olajsav hatása eltér a két aktivátor esetében. Összhangban a korábbi adatokkal, hogy oldatban a retepláz kevésbé hatásos aktivátor mint a tPA [63], a mi kísérleteinkben is előbbi mellett a keletkező plazmin kisebb koncentrációja miatt a turbiditás magasabb értékeket ér el. Ugyanakkor a fibrin kofaktoral zajló fokozott aktivációnak köszönhetően, a fibrinolitikus fázisban a reteplázzal és tPA-val mért lízisidők azonosak (**51. ábra, A és B betéte**) annak ellenére, hogy retepláz mellett nagyobb mennyiségű fibrin oldására kerül sor.

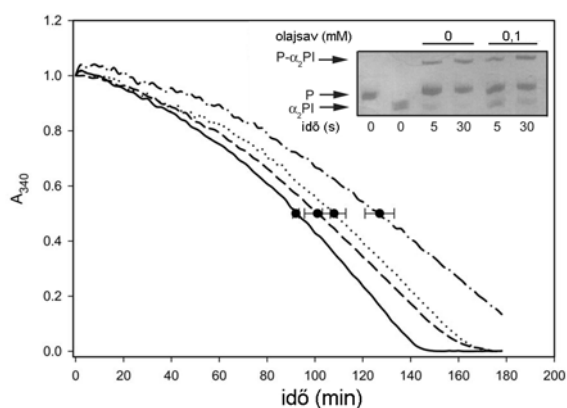


51. ábra: Olajsav hatása a plazminogén aktivációra és fibrin(ogén) lebontására. [XVII]

Plazminogén (10 nM) tartalmú fibrinogénhez, amely 0 (folytonos vonal), 100 (pontosított vonal), 200 (szaggatott vonal) vagy 400 (szaggatott és pontosított vonal) μM olajsavat is tartalmazott, 10 nM trombint és 5 nM tPA-t (A) vagy reteplázt (B) adtunk hozzá és az abszorbanciát folyamatosan mértük 340 nm-en (A_{340}) 37 °C-on. A szimbólumok a lízisidőt jelölik ($t_{1/2}$). **Betét:** $t_{1/2}$ értékek a reakció kezdetétől (●) vagy a maximális A_{340} -t követően (○).

A fentiekben ismertetett olajsav hatások segítik a plazminogén aktivátorok *in vivo* fibrinolitikus hatékonyságára és fibrin specificitására vonatkozó adatok jobb értelmezését. Egyben hangsúlyozzák annak szükségét, hogy a trombolitikus ágensek *in vitro* enzimológiai értékelését nemcsak fibrin jelenlétében végezzük el, hanem a trombus összetételében azonosított egyéb modulátorok mellett is. Így az eddigi *in vitro* adatok

alapján [63,193] a retepláz aktivátor hatékonysága 2 – 4-szer kisebb a vad típusú tPA-hoz képest, de mint trombolitikus ágens azonos, vagy jobb terápiás eredményeket produkál [64]. Olajsav hiányában a mi adataink szerint is 2-szer magasabb a vad típusú tPA sebességi állandója a plazminogén aktivációban (**47. ábra, betétek**), de fibrin felszínen olajsav mellett az arány megfordul a retepláz javára (**9. táblázat**). Ha az aktivátorok hatását olyan modellrendszerben vizsgáljuk, amely nyomon követi a plazminogén aktiváció következményeit mind a fibrinogén, mind a fibrin vonatkozásában (**51. ábra**), további részletekre is fény derül: olajsav mellett a retepláz nagyobb fibrin-specifitással rendelkezik és jobban kíméli a fibrinogént. Mivel a **51. ábránál** alkalmazott kísérleti összeállítás azt a szituációt is modellezi, amikor a terápiásan használt aktivátorok a frissen keletkező hemosztatikus (azaz fiziológiásan szükségszerű) alvadékokba bezáródnak és így ezek idő előtti feloldásához vezetnek, eredményeink még egy másik klinikai tapasztalatra is magyarázatot adnak. Mivel a hemosztatikus alvadékok feloldását teszik felelőssé a trombolízis során fellépő vérzéses komplikációkért és az ezt modellező rendszerben (**51. ábra**) nincs különbség a retepláz és tPA lízisidő értékei között, nem meglepő a két aktivátorral tapasztalt azonos hemorrhágiás rizikó [64].



52. ábra: Olajsav hatása a plazmin α_2 -plazmin inhibitorral történő inaktiválására. [XVII]

A plazminogén (0,25 μ M) tartalmú fibrin oldását 10 nM tPA-val indítottuk és az abszorbanciát 340 nm-en követtük. A szaggatott és szaggatott-pontozott vonallal jelölt esetekben a fibrin 0,25 μ M α_2 -PI-t tartalmaz, míg a pontozott és szaggatott-pontozott vonallal jelölt esetekben a tPA 0,3 mM olajsavval együtt került a fibrin felszínére. A szimbólumok a lízisidőt jelölik. **Betét:** olajsav hatása a plazmin- α_2 -PI reakcióra. A plazmint (P, 0,25 μ M) és az α_2 -PI-t (0,1 μ M) 20 °C-on inkubáltuk olajsav nélkül vagy olajsav jelenlétében és a jelzett időpontokban (a 0. perc a reagensok összekeverés előtti állapotát jelzi) vett mintákat SDS kezelés után nem redukáló körülmények között 12,5 % poliakrilamid gélen elektroforézissel vizsgáltuk.

A plazmin amidolitikus és fibrinolitikus aktivitásának gátlása ellenére az olajsav nem módosítja a proteáz érzékenységet a fő plazma inhibitorával szemben, az α_2 -PI-vel szemben (**52. ábra, betét**). Ennek következtében az olajsav és az α_2 -PI (a trombusokban előforduló koncentráció mellett [53]) additív gátlást eredményez a fibrin

alvadékban (52. *ábra*). A változatlan inhibitor érzékenység egyben azt is jelzi, hogy a plazmin gátlása nem a zsírsav detergens hatása miatt fellépő denaturáció, hanem specifikus interakció következménye. Talán a gátlás alapja, hogy az olajsav az 5. kringle-hez kötődik [191] és konformációváltozást indukál a proteáz doménben (emellett szólnak a következő alfejezetben ismertetett eredményeink is). Ugyanakkor az olajsav nem érinti az 1. kringle-t, amely viszont részt vesz az α_2 -PI-plazmin interakció kezdeti lépésében [194], és így az inaktiválás zavartalanul végbemehet.

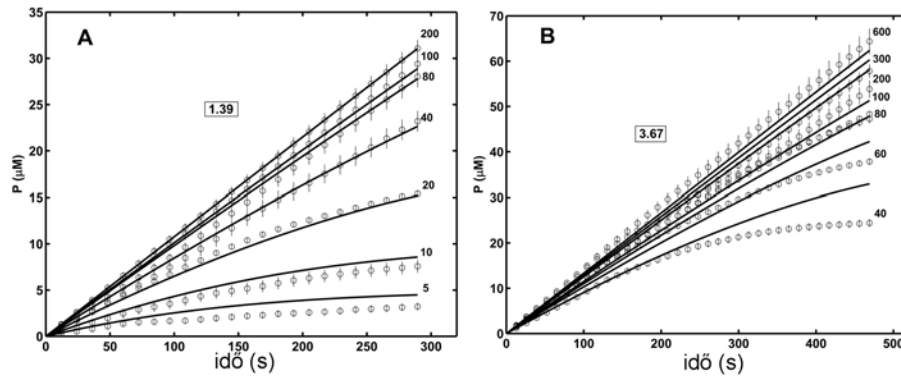
Összességében eredményeink alapján az a koncepció alakul ki, hogy az olajsav olyan tényező, amely a fibrin alvadékra lokalizálja a plazmin hatást úgy, hogy egyfelől felszínén serkenti a plazminogén aktivációt, másfelől a folyadék fázisban gátolja a plazmin aktivitást. Emellett a trombusok változó olajsav tartalma hozzájárulhat a trombolízis ingadozó terápiás kimeneteléhez különböző betegknél.

4.7.3. Plazmin gátlása szabad zsírsavakkal

Az előző fejezetben ismertettem, hogy az olajsav reverzibilisen gátolja a plazmint (49. *ábra*). A gátlás pontos jellemzésére további vizsgálatokat végeztünk. Mivel a vérlemezke membrán foszfoglicerolipideiben előforduló zsírsavak 22, 20, illetve 19 %-a arachidonsav, sztearinsav, illetve olajsav [185] indokoltnak látszott e három zsírsav hatásainak összehasonlítása. A gátlástípus jellemzéséhez a Spectrozyme-PL szubsztráton végzett mérést választottuk, mert a fibrintől eltérően csak egy kötés hidrolízise történik (tehát a meghatározott kinetikai paramétereknek közvetlen fizikai jelentésük is van) és az egyik terméknek, a *p*-nitroanilinnek (pNA) a magas extinkciós együtthatója miatt a mérés sokkal érzékenyebb a plazmin aktivitásváltozásaira mint a fibrinoldás követése. A [XIX] melléklet 1. ábrája kapcsán részletezett műtermék hatások miatt e vizsgálatokhoz olyan relatíve magas plazmin koncentrációkat kellett használni, amelyeknél a termék koncentráció emelkedése nem lineáris a vizsgált idő alatt, a kezdeti reakciósebességet nem tudjuk megbízhatóan megközelíteni lineáris függvényekkel és így a klasszikus Michaelis-Menten kinetika differenciálegyenlete nem alkalmazható. Emiatt az ún. folyamat-görbe (progress curve) analízisre kényszerültünk, amikor a reakció lefolyását akár a szubsztrát teljes elfogyásáig követjük. Az irodalomban egyetértés van abban, hogy a folyamat-görbe analízis információtartalma és megbízhatósága jobb, mint a kezdeti reakciósebesség analízisé: egy reakcióelegyből több kísérleti pontot nyerünk (pl. a mi méréseinkben minden reakcióelegyből 60 mérés történik az idő függvényében), méghozzá tökéletesen azonos enzim, aktivátor vagy inhibitor koncentrációk mellett. További előny, hogy a reakcióban felhasználódó vagy termelődő komponensek automatikusan változnak, ami részben

helyettesíti a kezdeti reakciósebesség vizsgálatánál alkalmazandó széles skálájú szubsztrát koncentrációkat [195-197]. A megközelítés hátránya viszont az, hogy komoly matematikai feldolgozást igényel: a kezdeti reakciósebességre alkalmazható egyszerű differenciálegyenletek helyett a folyamat-görbét leíró modell szerint integrált formájukat kell használni. A feladat megkönnyítésére 25 évvel ezelőtt olyan egyszerű programokat vezettek be, amelyek numerikus integrálással oldják meg a differenciálegyenleteket a folyamat különböző stádiumaiban és így szimulálják a folyamat-görbét [198], vagy későbbi változatban már a kísérleti pontokhoz való illesztést is lehetővé tették [199]. A differenciált egyenletek numerikus megoldása mellőzi annak szükségét, hogy algebrai formában adjuk meg az integrált egyenleteket. Ennek fejében azonban kénytelen reakciósebességi állandókkal operálni a matematikai szimuláció alatt annak ellenére, hogy a valós kísérletben az enzim-szubsztrát komplex keletkezésére és lebontására vonatkozó közvetlen információ legtöbbször nem kapható meg és így nem a sebességi állandók abszolút értékeire, hanem legfeljebb azok arányára (tipikusan K_M formájában) tudunk következtetni. Így az analízis után a szakértő személynek kell eldöntenie, hogy a kísérleti összeállítás ismeretében a program által becsült sebességi állandókból képzett melyik aránynak van fizikai értelme. Bár a folyamat-görbét analizáló programok szerzői hangsúlyozzák ezt a sajátosságot [198,199], a program felhasználói gyakran megfélekeznek erről. Emiatt még 2007-ben is magas impaktfaktorú folyóiratokban lehet olvasni olyan közleményeket, hogy folyamat-görbe analízissel a szerzők meghatározták a sebességi állandókat (az csak ráadás, hogy egy szubsztrát- és egy inhibitor-koncentrációval dolgozva állítólag 5 sebességi állandót sikerült azonosítani) [200]. Az elérhető analizáló programok helytelen használatát megelőzhetné, ha ezek nemcsak az állandók becsült értékéről, hanem statisztikai megbízhatóságukról is információt szolgáltatnának, ami figyelmeztetné a kutatókat az értékelésben rejlő problémákra. Erre viszont az univerzális használatra szánt programok közül egyik sem képes. Ezért amikor a folyamatgörbe-analízis szükségességével szembesültünk, új analizáló programot kellett kidolgozni, amely a számítástechnika mai fejlettségi szintje mellett minden kutató számára elérhető számítógépen elfogadható gépidőn belül a kísérlet valódi tartalmának megfelelő kinetikai paramétereket azonosít. Eljárásunk nem reakciósebességi állandókkal operál, hanem az alkalmazott modellben általuk képzett arányszámokkal, amelyekre a mérés valóban érzékeny [195]. Továbbá a 3.6 fejezetben részletezett Monte Carlo szimulációnak köszönhetően nemcsak a paraméterek becsült értékét, hanem azok statisztikai eloszlását is meghatározzuk, ami hűen tükrözi a kísérletből adódó szórást.

Az oleát és arachidonát jelenlétében valamint zsírsav hiányában végzett méréseknél a mérési adatokhoz a legegyszerűbb séma által leírt folyamat-görbét tudtuk kielégítően illeszteni (**53. ábra, A**): $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$, ahol E a plazmint, S a Spectrozyme-PL-t, P a pNA-t, a k_1 , k_2 és k_{-1} a megfelelő sebességi állandókat jelöli (*Modell 1.*). Kvázi steady-state feltételezéssel a séma sebességére vonatkozó differenciálegyenlet $\frac{dP}{dt} = \frac{k_p \cdot E_{t0} \cdot (S_0 - P)}{K_M + S_0 - P}$, ahol E_{t0} és S_0 a plazmin és a szubsztrát kezdeti koncentrációi, $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ a Michaelis állandó, $k_p = k_2$ a katalitikus állandó [195]. Az egyenlet integrált formája $t = \frac{1}{k_p \cdot E_{t0}} P + \frac{K_M}{k_p \cdot E_{t0}} \ln \frac{S_0}{S_0 - P}$, amelynek inverz függvényét illesztjük a mérési adatokhoz a [XIX] mellékletben leírtak szerint.



53. ábra: Plazmin amidolitikus aktivitása oleát és sztearát jelenlétében. [XIX]

A Spectrozyme-PL (a vonalak végén μM -ban jelzett koncentrációban) hidrolízisét követtük 20 nM plazmin hatására 10 μM oleát (A) vagy 115 μM sztearát (B) jelenlétében. A szimbólumok a mért pNA koncentrációt (átlag és SD) jelölik, a vonalak pedig a *Modell 1.* szerinti globális (az összes koncentrációnál mért pontokhoz végzett) illesztés legjobb eredményét mutatják be. A bekeretezett számok az illesztés megfelelési fokát jelzik ($\sqrt{\chi^2/N}$, ahol N a mért pontok száma) [XIX].

Mivel sztearát jelenlétében a reakció jobban lassul mint a *Modell 1.* szerinti előrejelzés (**53. ábra, B**), más modellt is teszteltünk, amely magyarázhatja a megfigyeléseket. A lassítás egyik oka a termék felhalmozódása lehet, amely a

$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} E + P$ séma szerint befolyásolhatja a reakciósebességet (*Modell*

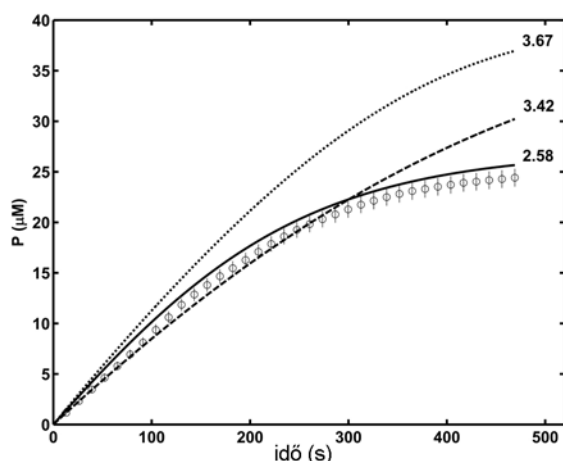
2.). Az ES és EP komplexre vonatkozó steady-state feltételezéssel a séma sebességére

vonatkozó differenciálegyenlet $\frac{dP}{dt} = \frac{k_p \cdot E_{t0} \cdot (S_0 - P)}{K_M \cdot (1 + K_i \cdot P) + S_0 - P}$, ahol $K_M = \frac{(k_{-1} + k_2) \cdot k_3}{k_1 (k_2 + k_3)}$ a

Michaelis állandó, $k_p = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$ a katalitikus állandó [195] és $K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}$ a termékre

vonatkozó asszociációs egyensúlyi állandó. Bár *Modell 1.* és *Modell 2.* szerint a K_M és k_p

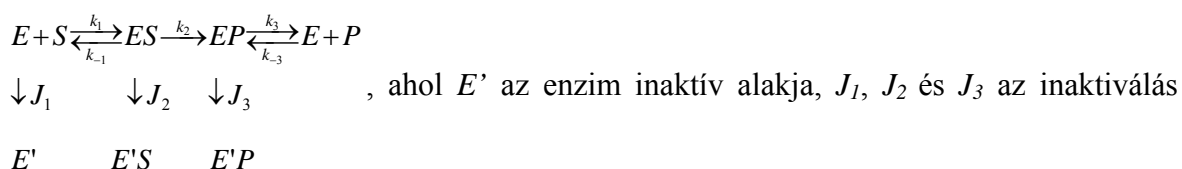
algebrai alakja eltér egymástól, a katalitikus mechanizmus vonatkozásában jelentésük azonos: a K_M azt a szubsztrát koncentrációt jelöli, amelynél a reakció sebesség az adott enzim koncentrációval elérhető maximális érték fele, míg k_p elsőrendű sebességi állandó, amely az enzim-szubsztrát komplex termék-képző kapacitását jellemzi. A *Modell 2.* integrált egyenlete $t = \frac{1-K_M \cdot K_i}{k_p \cdot E_{t0}} P + \frac{K_M (1+S_0 \cdot K_i)}{k_p \cdot E_{t0}} \ln \frac{S_0}{S_0-P}$, amelynek inverz függvényét illesztjük a mérési adatokhoz a [XIX] mellékletben leírtak szerint.



54. ábra: A plazmin sztearát jelenlétében mért katalitikus hatása három különböző modell szerint. [XIX]

A Spectrozyme-PL (40 μM) hidrolízisét követtük 20 nM plazmin hatására 115 μM sztearát jelenlétében. A szimbólumok a mért pNA koncentrációt (átlag és SD) jelölik, a vonalak pedig a *Modell 1.* (pontosított vonal), *Modell 2.* (szaggatott vonal) vagy *Modell 3.* (folytonos vonal) szerinti globális (az összes koncentrációnál mért pontokhoz végzett) illesztés legjobb eredményét mutatják be. A görbék melletti számok az illesztés megfelelési fokát jelzik ($\sqrt{\chi^2}/N$, ahol N a mért pontok száma) [XIX].

Bár a *Modell 2.* szerinti illesztés jobban közelítette a mért adatokat (54. ábra), nem tudta elfogadhatóan leírni a folyamat lassulását. Ezért a *Modell 3.*-ban az enzim instabilitását is figyelembe vettük [196,197]. Ebben a reakcióséma



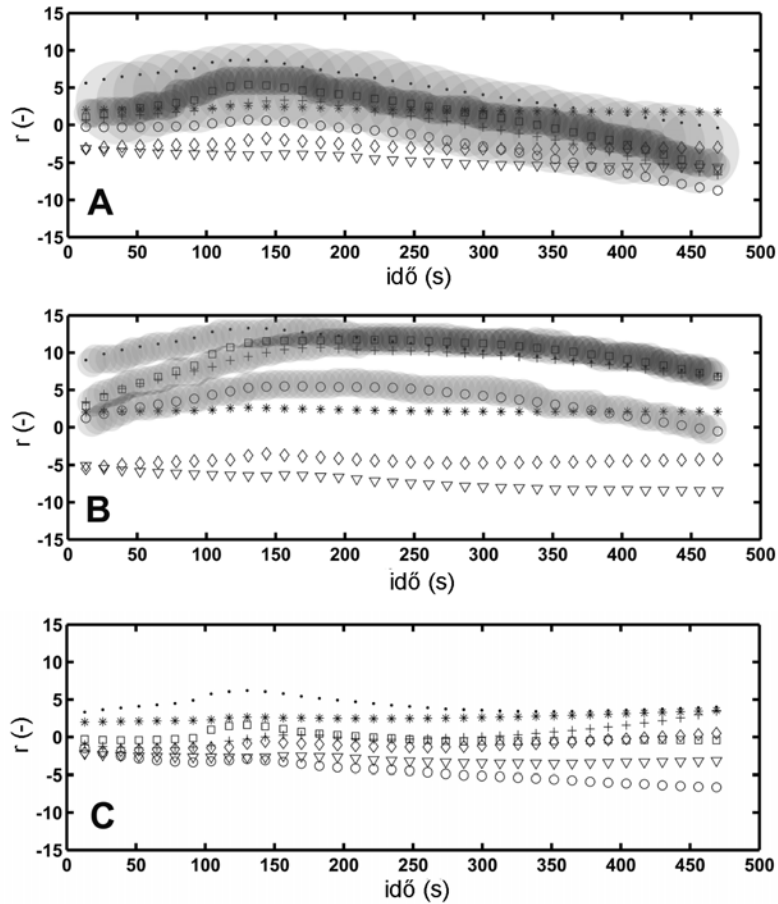
sebességi állandói. Független mérésekkel igazoltuk, hogy sztearát mellett a szabad plazmin (E) inaktiválása a reakció időtartama alatt elhanyagolható (vagyis $J_1=0$), ezért a modell

differenciálegyenleteit csak a J_2 és J_3 fennállására vezettük le $\frac{dP}{dt} = \frac{k_p \cdot E_t \cdot (S_0 - P)}{K_M \cdot (1 + K_i \cdot P) + S_0 - P}$ és

$$\frac{dE_t}{dt} = -\frac{J_2 \cdot E_t (S_0 - P) / K_M + J_3 \cdot E_t \cdot K_i \cdot P}{1 + K_i \cdot P + (S_0 - P) / K_M}. \text{ Ebben az esetben a változó enzimkoncentráció}$$

miatt a P integrálásánál numerikus megoldást kellett alkalmazni [201]. Bár szemmel is a

Modell 3. felel meg a legjobban a kísérleti adatoknak (**54. ábra**), ezt a következtetést a reziduális szórás analízisével [202] is megerősítettük (**55. ábra**). A *Modell 1.* és *Modell 2.* szerinti reziduális szórás szisztematikus eltéréseket mutat, ami a modellek inadekvát jellegére utal. Az anomáliák viszont eltűnnek a *Modell 3.* szerinti értékelésnél, ami alátámasztja a helyességét.

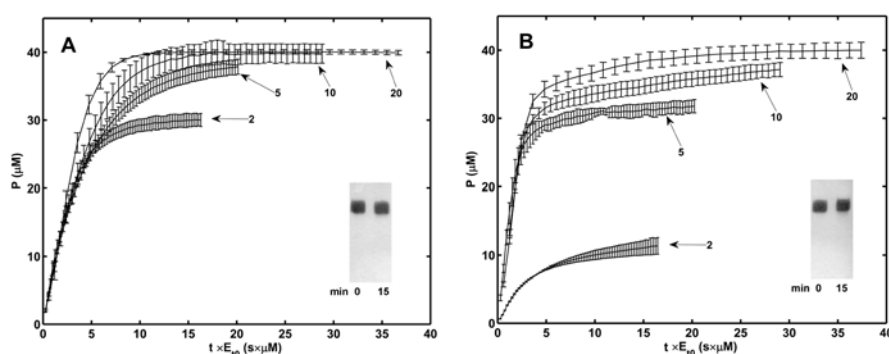


55. ábra: A plazmin aktivitás három modelljének elkülönítése a reziduális szórás ábrázolásával. [XIX]

A reziduális szórás értékét a $r = \frac{P_{mean,i,j} - P_{i,j}^M}{P_{std,j}^M(P_{mean,i,j})}$ egyenlet szerint számoltuk, ahol $P_{mean,i,j}$ adott j szubsztrátkoncentráció mellett i időpontban mért P átlaga, $P_{i,j}^M$ a modell szerint becsült P ugyanarra a szubsztrátkoncentrációra és időpontra, $P_{std,j}^M(P_{mean,i,j})$ a $P_{mean,i,j}$ -re vonatkozó modellezett standard deviancia. A $P_{std,j}^M(P_{mean,i,j})$ értékét a $P_{std,j}^M(P_{mean}) = b_j(P_{mean})^{a_j}$ egyenlet logaritmikus formájához történő lineáris regresszióval határoztuk meg. Az **A** rész *Modell 1.* szerint készült, a **B** rész *Modell 2.* szerint, a **C** rész pedig *Modell 3.* szerint. A beárnyékolt területek a reziduális szórás szisztematikus anomáliáit jelölik. A szimbólumok különböző kezdeti szubsztrátkoncentrációknál számolt reziduális szórást jeleznek: 40 (○), 60 (□), 80 (•), 100 (+), 200 (*), 300 (◇), 600 (▽) μM .

A reziduális szórás analízise segíti az inadekvát modellek kizárását, de még nem bizonyítja a vizsgálat alatt fellépő plazmin inaktiválását. Erre vonatkozó kísérleti adatokat az ún. Selwyn-teszt szolgáltat. A teszt elve, hogy ha a vizsgálat alatt az enzim

inaktíválódik, akkor azonos szubsztrát és változó enzim koncentrációk felhasználásával ezt ki tudjuk mutatni, mert a kevesebb enzim gyorsabban inaktíválódik és a reakció hamarabb áll le. A jelenséget a legjobban az idő és enzimkoncentráció szorzatának függvényében ábrázolt termék-koncentráció változása szemlélteti [203]. Zsírsavak hiányában a Selwyn-teszt minimális plazmin aktivitás vesztésről tanúskodik és jelentősen alacsonyabb termék-szintet lehet megfigyelni a reakció végstádiumában sztearát jelenlétében (**56. ábra**). Ilyen formában a *Modell 3.* érvényessége fizikai bizonyítékot is nyer a sztearát mellett mért plazmin aktivitás esetében. Az inaktíválás hátterében valószínűleg nem a plazmin fokozott autolízise áll, hiszen a kimutathatóság határain belül a reakció időtartama alatt plazmin degradációs termékek nem jelennek meg (**56. ábra, betétek**).



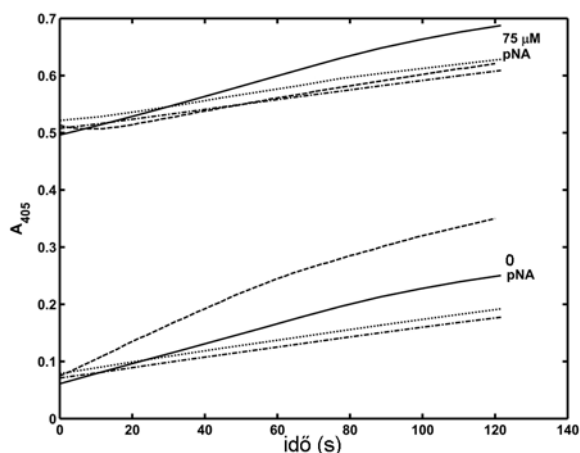
56. ábra: Plazmin aktivitás Selwyn-tesztje. [XIX]

A Spectrozyme-PL (40 μM) hidrolízisét követtük plazmin hatására zsírsavak hiányában (A) vagy 115 μM sztearát jelenlétében (B). A nyilak melletti számok a plazmin koncentrációt jelölik nM-ban. **Betétek:** a jelzett ideig plazmint (0,3 μM) inkubáltunk zsírsavak hiányában (A) vagy 115 μM sztearát jelenlétében (B) és ezt követően 10-15 %-os poliakrilamid gélen elektroforézissel vizsgáltuk nem-redukáló körülmények között.

További kísérletekkel a *p*-nitroanilint azonosítottuk mint a tényező, amely felelős az idő előtti enzimaktivitás-vesztésért a reakció alatt. Az amidolitikus aktivitás-vizsgálatot úgy is elvégeztük, hogy a plazmint előinkubáltuk a reakció termékeivel sztearát jelenlétében. Ha az előinkubációt lizinnel, ϵ -aminokapronsavval vagy fibrinogén degradációs termékekkel végezzük, amelyek a Spectrozyme-PL lebontása után szabaddá váló C-terminális lizint mimikálják, az amidolitikus reakció lefolyása nem változik, de ha *p*-nitroanilint használunk az előinkubációnál, a reakció azzal a kisebb sebességgel kezdődik, amely az amidolitikus reakció késői stádiumára jellemző sztearát jelenlétében (**57. ábra**). Így azt a következtetést lehet levonni, hogy a termék-gátlás csak az amidolitikus kísérleti összeállításhoz kötődik. Ennek ismeretében az a modell, amely a K_i és a J_3 beiktatásával képes kiszűrni a műtermék-hatást, nélkülözhetetlen eszközévé válik a valódi katalitikus és Michaelis állandók meghatározásának.

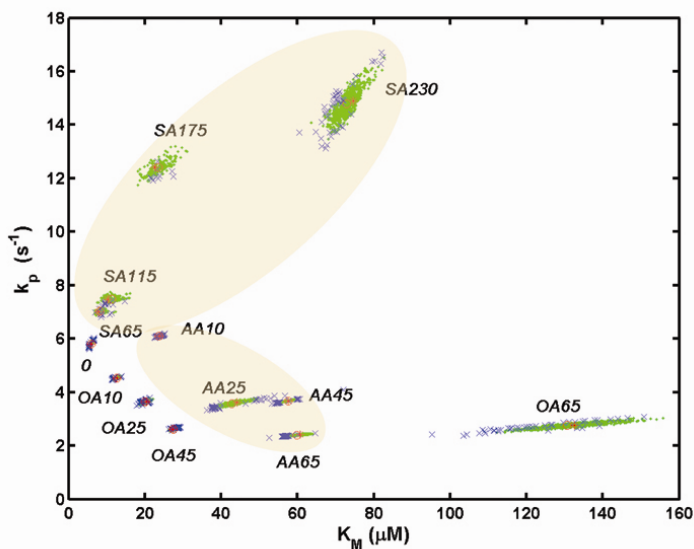
Az értékelés végeredményét az **58. ábra** és a **10. táblázat** foglalja össze. Mindhárom vizsgált zsírsav 10 – 20-szoros emelkedést okoz a plazmin K_M értékében. Az

oleát és arachidonát 10 – 65 μM koncentráció tartományban hatásos, míg a sztearát 65 μM feletti koncentrációban fejt ki szignifikáns hatást. A két telítetlen zsírsav (oleát és arachidonát) emellett a katalitikus állandó 2-szeres csökkenését is okozza, így kevert-típusú inhibitorként viselkedik. A sztearát hatása viszont szokatlan: a Michaelis állandó növekedéséhez a katalitikus állandó növekedése társul, ami telítő szubsztrát koncentrációk mellett látszólagos aktivátor hatásként jelentkezik. Ha viszont a k_p/K_M arányt értékeljük a sztearát is plazmin inhibitornak tekinthető, amelynek hatékonysága a legalacsonyabb a három vizsgált zsírsav közül (**11. táblázat**).



57. ábra: *p*-Nitroanilin hatása a plazmin amidolitikus aktivitására zsírsavak jelenlétében. [XIX]

A Spectrozyme-PL (80 μM) hidrolízisét követték plazmin hatására zsírsavak hiányában (folytonos vonal) vagy 115 μM sztearát (szaggatott vonal), 45 μM oleát (pontozott vonal), 45 μM arachidonát (ponttal szaggatott vonal) jelenlétében, pNA mellett vagy anélkül.



58. ábra: Plazmin kinetikai paramétereit zsírsavak jelenlétében. [XIX]

A k_p és K_M értékeit az **53. ábránál** leírtak szerint határoztuk meg *Modell 1.* alkalmazásával (oleát, OA és arachidonát, AA esetében) vagy *Modell 3.* alkalmazásával (sztearát, SA esetében). A Monte Carlo szimulációval nyert 1000 paraméterpár közül zöldben tüntettük fel a 95 %-os konfidencia tartományon belüli értékeket és kékben az azon kívülieket. A piros csillag a kísérlet alapján nyert legjobb becslés, míg a piros kör a Monte Carlo szimuláció utáni legjobb becslés. A zsírsav rövidítése utáni szám koncentrációját jelöli μM -ban, a „0” zsírsav hiányát jelzi. A beárnyékolt területek az azonos zsírsavhoz tartozó értékeket fedik.

10. táblázat: Plazmin kinetikai paramétereinek zsírsavak jelenlétében. [XIX]

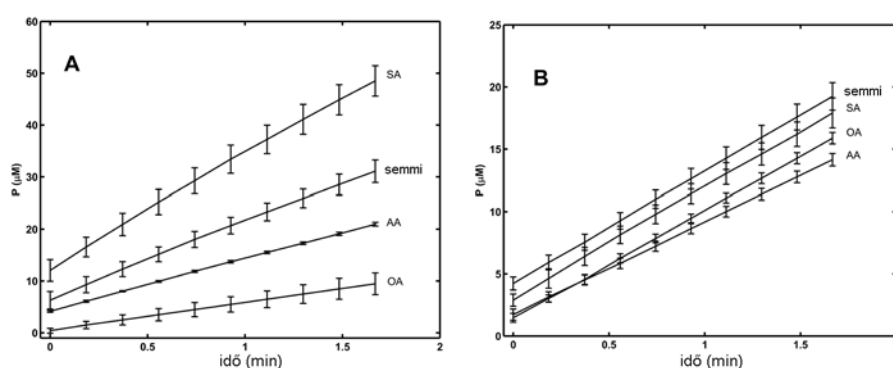
Az **58. ábrán** szereplő k_p és K_M számszerű értékei. Rövidítések: *LB*, legjobb becsült érték; *CI*, 95 %-os konfidencia tartomány; K_M , Michaelis állandó; k_p , katalitikus állandó; K_i , termék-enzim komplex asszociációs egyensúlyi állandója; J_3 , enzim-termék komplex inaktiválási sebességi állandója; *n.a.*, adott esetben nem alkalmazható. Zsírsav nélkül, oleát és arachidonát jelenlétében a paramétereket *Modell 1.* szerint határoztuk meg, míg sztearát jelenlétében a *Modell 3.* szerint (az enzim-szubsztrát inaktiválási állandó J_2 az illesztés során mindig 10^{-12} s^{-1} nagyságrendű értékeket kapott, tehát nem lehet jelentős hatással a modell szerint, ezért nem került bemutatásra).

zsírsav koncentráció (μM)	K_M (μM)		k_p (s^{-1})		K_i (μM^{-1})		J_3 (s^{-1})	
	LB	CI	LB	CI	LB	CI	LB	CI
0	5,89	5,43 – 6,38	5,81	5,70 – 5,93	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oleát								
10	12,58	11,68 – 13,41	4,54	4,48 – 4,60	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
25	20,09	18,76 – 21,26	3,65	3,56 – 3,73	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
45	27,49	26,43 – 28,57	2,63	2,58 – 2,68	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
65	131,09	115,33 – 146,13	2,75	2,57 – 2,95	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
arachidonát								
10	23,71	22,91 – 24,58	6,10	6,06 – 6,15	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
25	42,65	38,28 – 47,66	3,57	3,43 – 3,71	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
45	57,51	55,24 – 59,60	3,68	3,62 – 3,73	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
65	59,85	56,76 – 62,73	2,40	2,35 – 2,44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
sztearát								
65	8,17	7,35 – 9,10	7,03	6,93 – 7,12	0,025	0,011 – 0,053	0,026	0,018 – 0,038
115	11,33	9,42 – 13,41	7,48	7,37 – 7,61	0,012	0,008 – 0,402	0,056	0,001 – 0,158
175	23,37	20,98 – 26,88	12,39	11,92 – 12,73	0,007	0,005 – 0,009	0,062	0,052 – 0,069
230	72,96	69,86 – 75,86	14,77	13,94 – 23,85	0,002	0,001 – 0,003	0,074	0,001 – 0,356

11. táblázat: Plazmin katalitikus hatékonysága (k_p/K_M) zsírsavak jelenlétében. [XIX]

A k_p/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) arányt a 10. táblázat adatai alapján számoltuk.

zsírsav koncentráció (μM)	sztearát	oleát	arachidonát
0	0,99	0,99	0,99
10	-	0,36	0,26
25	-	0,18	0,08
45	-	0,10	0,06
65	0,86	0,02	0,04
115	0,66	-	-
175	0,53	-	-
230	0,20	-	-



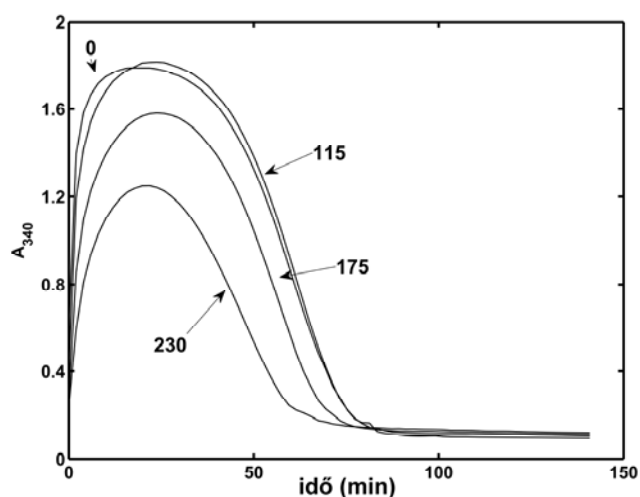
59. ábra: Des-kringle plazmin származékok amidolitikus aktivitása zsírsavak jelenlétében. [XIX]

A Spectrozyme-PL (120 μM) hidrolízisét követtük 20 nM miniplazmin (A) vagy mikropلاسmin (B) hatására zsírsavak hiányában (semmi) vagy 45 μM oleát (OA), 45 μM arachidonát (AA), 175 μM sztearát (SA) jelenlétében.

A zsírsavak célpontját a plazmin molekulán belül úgy közelítettük meg, hogy különböző fokban csonkított plazmin származékok amidolitikus aktivitását vizsgáltuk zsírsavak jelenlétében (59. ábra). A miniplazmin (des-kringle₁₋₄ plazmin) az 5. kringle és a katalitikus doménből áll, míg a mikropلاسmin (des-kringle₁₋₅ plazmin) csak a katalitikus domént tartalmazza. A Spectrozyme-PL telítő koncentrációjánál mindhárom zsírsav úgy befolyásolja a miniplazmin aktivitását mint a plazminét: látszólagos aktiválás figyelhető meg sztearát mellett valamint gátlás oleát és arachidonát mellett (59. ábra, A). A mikropلاسmin viszont nem érzékeny a zsírsavakra (59. ábra, B). Ez az eredmény kizárja a katalitikus domént mint a zsírsavak támadási pontja és amellett szól, hogy az 5. kringle jelenléte elegendő hatásuk kifejtéséhez. Ez a következtetés összhangban áll korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az olajsav egy nagyságrenddel nagyobb affinitással kötődik az 5. kringle-hez mint más kringle doménekhez [191]. Érdekes megjegyezni, hogy e tanulmány szerzői ugyanabban a koncentráció tartományban igazolták az olajsav hatását

a plazmin aktivitására makromolekuláris szubsztráton (prosztromelizin-1) mint az oleát és arachidonát a mi vizsgálatainkban (10 – 65 μM).

Hangsúlyozni kell, hogy a homogén oldatban végzett mérések alapján levont következtetéseket nem lehet automatikusan alkalmazni a heterogén fázisú fibrinolízisre, amikor a plazminogén aktivátorok hatására a plazmin közvetlenül a fibrinrostokon keletkezik, ahol védve van az inhibitor hatásokkal szemben [XXX]. Így valószínűleg a leírt zsírsav-hatások a plazmin molekulák azon frakcióján érvényesülnek, amely átmenetileg leválik a szabad, oldott fázisba. Ahogy viszont a **51. ábra** is igazolja az oldatban levő makromolekuláris szubsztrát (fibrinogén) vonatkozásában, az olajsav úgy módosítja a plazmin aktivitást, ahogy az amidolitikus vizsgálat alapján az várható. Megállapításaink prediktív erejét bizonyítja, hogy a sztearát mellett meghatározott nagyobb k_p értékkel összhangban, telítő fibrinogén koncentráció mellett (**3. táblázat**, fibrinogénre nézve $K_M=2 \mu\text{M}$) fokozott plazmin aktivitás figyelhető meg (**60. ábra**): a fibrinogén fokozott emésztése miatt kevesebb fibrin keletkezik trombin hatására (ahogy az alacsonyabb maximális A_{340} jelzi ezt) szemben az olajsav jelenlétében tapasztaltakkal (**51. ábra**).



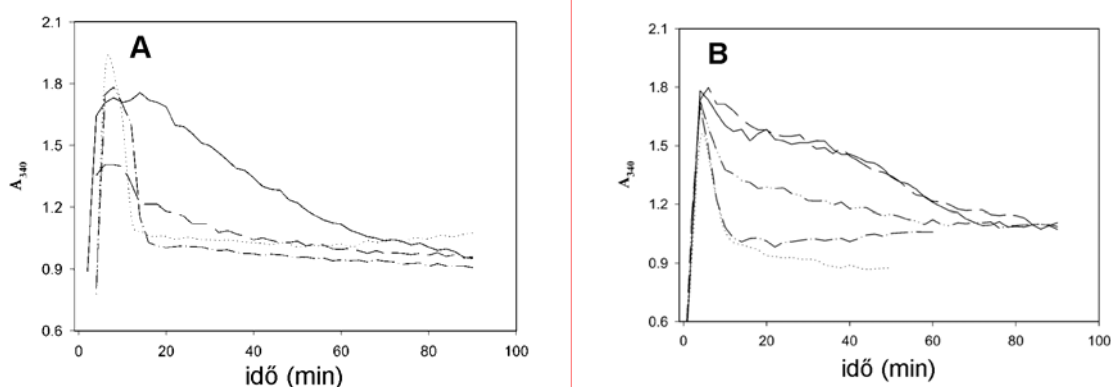
60. ábra: Sztearát hatása a fibrin(ogén) lebontására plazminnal.

Sztearát tartalmú fibrinogénhez (8 μM) trombint (160 nM) és plazmint (20 nM) adtunk hozzá és az abszorbanciát mértük folyamatosan 340 nm-en. A nyilak melletti számok a sztearát koncentrációját jelzik μM -ban.

A zsírsavak jelenlétében végzett enzimkinetikai vizsgálataink azt az általános lehetőséget szemléltetik, hogy egy regulátor képes az enzim kinetikai paramétereit egymástól függetlenül és ráadásul ellentétes irányba változtatni. Így az enzimaktivitás tekintetében a regulátor összehatása eltérhet a szubsztrát koncentráció függvényében. Ez az eredmény még egyszer aláhúzza azt a fontos módszertani követelményt, hogy folyamatgörbe analízisnél is csak széles skálán változtatott szubsztrát és regulátor koncentrációkkal végzett mérések alapján, megfelelő modell-elkülönítéssel és statisztikai feldolgozással lehet megbízható kinetikai paramétereket nyerni.

4.8. IgG modulátor szerepe a fibrinolitikus enzimek működésében

Az értekezés utolsó fejezete arra szolgáltat példát, hogy enzimaktivitás-vizsgálatokkal közelebb juthatunk egy betegség klinikai tüneteinek megértéséhez. Az antifoszfolipid szindróma (APS) olyan autoimmun betegség, amelyben a vérben lupusz antikoaguláns és antikardiolipin (aCL) antitestek mutathatók ki, klinikailag pedig visszatérő vénás és artériás trombotikus események és vetélések jellemzők [204-206]. A trombózis molekuláris háttere még mindig bizonytalan annak ellenére, hogy sok esetben a foszfolipid-függő antikoaguláns mechanizmusok zavarát lehet kimutatni [204,207]. A trombotikus szövődmények az aCL antitestek IgG izoformájához kötődnek, ami pedig az antitestek antigén specificitását illeti, legtöbbször β_2 -glycoprotein-1, protrombin és oxidált lipidek ellen irányulnak [208]. Ugyanakkor egyre több adat a fibrinolitikus rendszer érintettségére utal, pl. egyes APS betegek vérében tPA [209] és plazminogén elleni [210,211] antitestek jelenlétét mutatták ki. Ennek fényében megvizsgáltuk APS betegek vérplazmájának fibrinolitikus potenciálját (**61. ábra**).



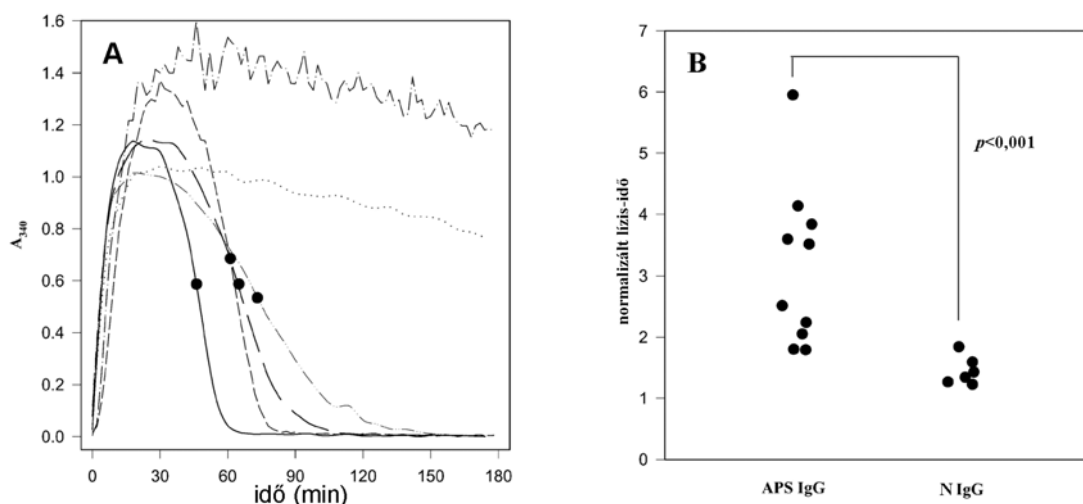
61. ábra: Vérplazma alvadékok keletkezése és oldása. [VII]

A. A rekalcifikált citrátos vérplazmát trombinnal megalvasztottuk és az alvadék turbiditását követtük. A vérplazma egészséges egyéntől (pontosított és ponttal szaggatott vonal) vagy APS betegtől (folytonos és szaggatott vonal) származott. A trombinnal együtt adott 10 nM tPA-val (szaggatott és ponttal szaggatott vonal) vagy 0,5 μ M plazminnal (folytonos és pontosított vonal) indukáltuk a lízist.

B. A plazma alvadékokat normál plazmából készítettük hozzáadott anyag nélkül (pontosított vonal) vagy 40 μ M IgG hozzáadásával. A hozzáadott IgG-t egészséges egyéntől (egy ponttal szaggatott vonal) vagy három különböző APS beteg (folytonos, szaggatott és két ponttal szaggatott vonal) véréből izoláltuk. A lízist trombinnal együtt adott 0,5 μ M plazminnal indítottuk.

Mivel az APS plazmából készült alvadékok mind tPA-val, mind plazminnal indított oldása lassabb a normál plazmához képest (**61. ábra, A**) és ez a gátlás reprodukálható normál plazmához hozzáadott APS IgG-vel (**61. ábra, B**), indokolt a plazminaktivitás vizsgálata APS IgG jelenlétében. Az IgG jelenléte a fibrinben szignifikánsan meghosszabbítja lízis-idejét (**62. ábra, A**). A különböző forrásból származó IgG azonban eltérő fokú gátlást eredményez a plazmin aktivitásban fibrin szubsztráton (**62.**

ábra, B). Az egészséges egyénektől származó IgG okozta hosszabbodás legalább 25 % és legfeljebb 200 %, míg APS IgG-vel legalább 60 % és legfeljebb 600 %. Az azonos moláris koncentrációjú albumin nem befolyásolja a plazminnal indított fibrinolízist, csak két nagyságrenddel magasabb koncentrációjú albumin reprodukálja a normál IgG hatásait, ami az IgG hatások specificitására utal.



62. ábra: IgG és albumin hatása a fibrin oldására az alvadékban levő plazminnal. [VII]

A. A fibrinogénhez (6 μ M), amely nem tartalmazott hozzáadott anyagot (folytonos vonal) vagy 18 μ M normál IgG-t (hosszan szaggatott vonal), 18 μ M 1. APS beteg IgG-t (pontosított vonal), 18 μ M 2. APS beteg IgG-t (két ponttal szaggatott vonal), 40 μ M BSA-t (röviden szaggatott vonal) tartalmazott, trombint (20 nM) és plazmint (3 nM) adtunk hozzá és az abszorbanciát mértük 340 nm-en. A szimbólumok a lízis-időt jelölik.

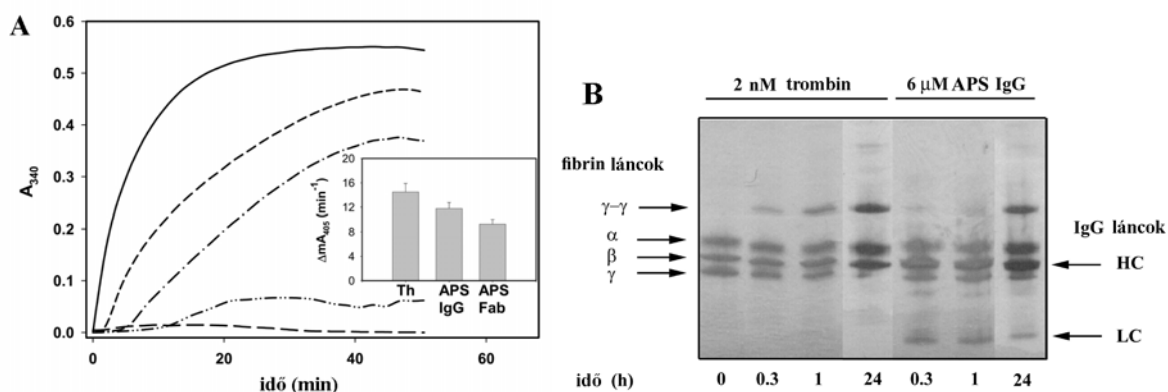
B. 18 μ M IgG jelenlétében mért lízis-idő az A. részben leírt körülmények között relatív egységekben (1 a hozzáadott IgG nélkül mért lízis-idő). Minden szimbólum egy-egy APS beteg vagy egészséges egyén IgG preparátumával végzett mérés eredményét ábrázolja.

Ezek az eredmények nagyfokú variabilitást igazolnak az IgG által fibrinolízisre gyakorolt hatásaiban, amely az IgG molekulák heterogenitásával függhet össze mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között. Ilyen következtetés mellett szólnak az IgG fragmentumokkal végzett méréseink is (nem ábrázolt adatok, [VII]): az F_{ab} fragmentumok, amelyek az IgG antigén-specificitásáért felelősek, moláris alapon még hatékonyabban gátolják a fibrin oldását mint a teljes IgG molekulák. Ugyanakkor a változatlan F_c fragmentumok nem befolyásolják a fibrinolízist. Az IgG hatás nem közvetlenül a plazminra irányul, hiszen sem a normál, sem az APS IgG nem módosítja a plazmin amidolitikus aktivitását Spectrozyme-PL szubsztráton. Ugyanakkor az IgG-k eltérő módon hatnak a fibrin jelenlétében mért amidolitikus aktivitásra. A szintetikus szubsztráttal versengve 6 μ M fibrin monomer 40 %-al csökkenti a plazmin aktivitását Spectrozyme-PL-en és ugyanez a plazmin aktivitás, ha a fibrin mellett 16 μ M normál IgG is jelen van. Ha viszont 16 μ M APS IgG-t alkalmazunk a fibrinnel együtt, a plazmin

aktivitás a fibrin hiányában mért érték 85 %-ára emelkedik, vagyis az APS IgG részben felfüggeszti a fibrin-Spectrozyme-PL kompetíciót. Ez a hatás felveti annak lehetőségét, hogy az APS IgG kölcsönhatásba lép a fibrinnel vagy a fibrinhez kötött plazminnal és ennek következtében a fibrin proteáz-érzékenysége csökken, illetve megváltoznak a fibrinhez kötött enzim kinetikai tulajdonságai.

Ezekkel a vizsgálatokkal elsőként írtuk le, hogy APS betegeknél olyan antitestek is előfordulnak, amelyek zavarják a plazmin hatását fibrin szubsztráton és a gátolt fibrinolízis révén hozzájárulhatnak a trombotikus hajlamhoz. Később több APS betegnél is beszámoltak erről a jelenségről [212].

Enzimaktivitás-vizsgálatokkal még egy, eddig ismeretlen tényezőt sikerült azonosítanunk az APS trombotikus tüneteinek hátterében. Korábbi tanulmányokból lehetett tudni, hogy viszonylag nagy gyakorisággal (10 APS beteg közül 2-nél) olyan anti-trombin antitestek fordulnak elő, amelyek zavarják a trombin inaktivációját a fő plazma inhibitorával, az antitrombinnal [213]. Arra viszont nem volt adat, hogy mi történik az IgG-ben bezárt trombin enzimaktivásával. Ha az anti-trombin antitest inhibitorként viselkedik, jelenléte vérzékenységhez vezetne, amennyiben viszont csak kivédi a plazma inhibitorok hatását, így konzerválná a trombin aktivitást és trombózisra hajlamosítana. Az általunk vizsgált 23 APS betegből izolált IgG preparátumok közül egy IgG-nél fibrinogént alvasztó aktivitást detektáltunk (**63. ábra**).



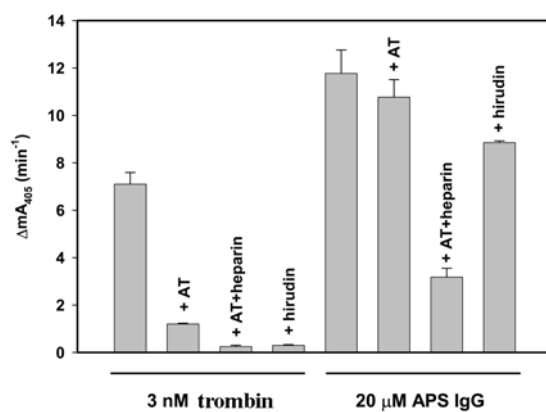
63. ábra: Trombin aktivitás APS IgG-ben. [XII]

A. Fibrinogénhez (30 μM) azonos térfogatú 2 nM trombit (folytonos vonal), 30 μM APS IgG-t (szaggatott vonal), 30 μM APS F_{ab}-t (egy ponttal szaggatott vonal), 30 μM APS F_c-t (két ponttal szaggatott vonal) vagy 30 μM normál IgG-t (hosszan szaggatott vonal) adtunk hozzá és az abszorbanciát követtük 340 nm-en (A_{340}). **Betét:** Spectrozyme-TH (H-D-hexahidrotirozil-L-alanil-L-arginin-p-nitroanilid) hidrolízisét vizsgáltuk 6 nM trombin (Th), 20 μM APS IgG vagy 20 μM APS Fab hatására (ΔmA_{405} , 405 nm-nél mért abszorbancia-változás szorozva 1000-rel).

B. XIII-as faktor aktivációja APS IgG-vel. F-XIII tartalmú fibrinogénhez trombit vagy APS IgG-t adtunk hozzá és a jelzett időpontokban a fibrint 4 M urea 1 % β -merkaptóetanol és 1 % SDS tartalmú pufferben oldottuk fel. 4-15 % poliakrilamid gélelektroforézis után ezüstfestéssel láthatóvá tettük a polipeptidláncokat. A γ -dimerek megjelenése jelzi a F-XIIIa aktivitását. Rövidítések: HC, APS IgG nehéz lánc; LC, APS IgG könnyű lánc.

Az APS IgG preparátum trombin aktivitással rendelkezik mind szintetikus kis moltömegű (63. *ábra, betét*), mind természetes makromolekuláris szubsztrátokon: fibrinogén (63. *ábra, A*) és F-XIII (63. *ábra, B*). A trombin aktivitás az IgG papainos emésztése után az Fab fragmentumhoz kötődik. Nincs teljes megegyezés a különböző szubsztrátokon mért APS IgG-hez kötött trombinaktivításban: 20 μmol APS IgG amidolitikus aktivitása 5 nmol tiszta trombinnak felel meg, míg 30 μM APS IgG lassabban alvasztja meg a fibrinogént mint 2 nM trombin (63. *ábra, A*). A különbséget azzal lehet magyarázni, hogy az IgG-hez kötött trombin vagy nehezebben fér hozzá a makromolekuláris szubsztráthoz, vagy ebben a formában nagyobb katalitikus hatékonyságot mutat a kis peptid szubsztrátokon. Mindkét aktivitás alapján azonban a bezárt trombin az IgG frakcióban 0,1 %-nál kisebb moláris arányt képvisel, ami összhangban áll más anti-trombin antitestekről közölt adatokkal [213]. Fibrinolízis szempontjából egy ilyen antitest jelenléte azt is jelenti, hogy az *in vivo* keletkező fibrin ellenálló lesz a plazmin hatással szemben, hiszen a benne zárt trombin aktiválja a F-XIII-t, amely kovalensen stabilizálja az alvadékot (63. *ábra, B*).

Az a tény, hogy a trombinaktivitás olyan IgG-preparátumban mutatható ki, amelyet vérplazmából izoláltunk, ahol hosszú időn át ki volt téve magas koncentrációjú proteáz inhibitoroknak, eleve azt feltételezi, hogy ebben a formában a trombin védve van az inhibitorokkal szemben. Az APS IgG-hez kötött trombin és az inhibitorok viszonyát *in vitro* is megvizsgáltuk (64. *ábra*).



64. ábra: APS IgG-hez kötött trombin gátlása antitrombinnal és hirudinnal. [XII]

APS IgG-t (20 μM) 10 percig 0,3 μM antitrombinnal (AT) inkubáltunk heparin nélkül vagy 0,15 μM heparin jelenlétében, illetve 1 μM hirudinnal és ezt követően a maradvány trombinaktivitást mértük Spectrozyme-TH szubsztráton, amelyet abszorbanciaváltozásként (1000-rel szorozva, ΔA_{405}) ábrázoltuk. Összehasonlításként 3 nM trombin azonos körülmények között történő gátlását mutatjuk be.

Az APS IgG majdnem teljes védelmet jelent a trombin számára antitrombinnal és hirudinnal szemben (64. *ábra*). A heparin képes megszüntetni ezt a védőhatást

antitrombin esetében, de hirudinnál nem (nem ábrázolt adatok). Az APS IgG anti-trombin antitest frakciója nincs telítve trombinnal: hozzáadott trombin számára is hasonló védelmet biztosít és a hatás az IgG molekula F_{ab} frgmentumához kötődik (**12. táblázat**).

12. táblázat: APS IgG hatása trombin gátlására antitrombinnal és hirudinnal. [XII]

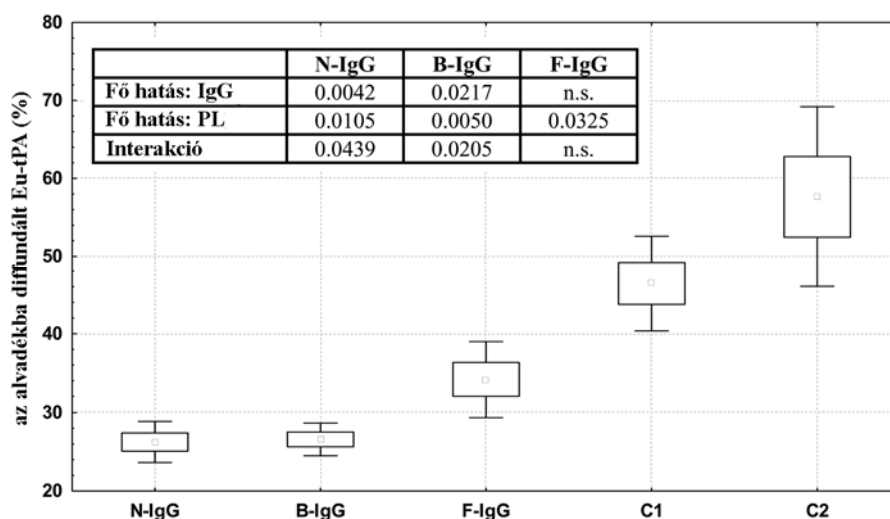
Trombin (3 nM) inaktiválását vizsgáltuk 0,3 μ M antitrombinnal (AT) vagy 1 μ M hirudinnal a **64. ábránál** leírtak szerint. A maradvány trombinaktivitást az eredeti aktivitás százalékában adjuk meg (átlag \pm SD)

hozzáadott anyag	inhibitor		
	AT	AT+150 nM heparin	hirudin
semmi	17,7 \pm 2,79	3,4 \pm 0,18	4,0 \pm 0,38
20 μ M APS IgG	81,1 \pm 3,42	20,1 \pm 1,60	67,2 \pm 1,60
20 μ M APS F_{ab}	69,1 \pm 2,48	37,8 \pm 1,50	58,8 \pm 1,42
20 μ M N IgG	37,6 \pm 1,71	9,7 \pm 0,53	3,5 \pm 0,32

Gyakorlati szempontból az anti-trombin APS IgG azonosítása arra hívja fel a figyelmet, hogy érdemes funkcionális, enzimaktivitási tesztekkel kiegészíteni a szokásos antigén-vizsgálatokat APS diagnózisa kapcsán, mert ez segíthet a helyes terápiás döntésben: jelen esetben heparin vagy direkt trombin inhibitor alkalmazásának kérdésében.

Összefoglalva, az APS szindróma diagnosztikai kritériumaihoz tartozó foszfolipid elleni antitestek [214] között olyan IgG-k fordulnak elő, amelyek vagy közvetlenül (a fibrinre kifejtett plazminaktivitás felfüggesztése révén), vagy közvetve (a trombinaktivitás fenntartása és fibrinszerkezet stabilizálása révén) anti-fibrinolitikus természetűek. Figyelembe véve a 4.7.1 fejezetben leírt foszfolipid hatásokat, ezen antitestek és foszfolipidek együttes jelenléte az APS betegek trombusaiban indokoltta teszi e két modulátor kombinált hatásának vizsgálatát a fibrinolízis egymást követő lépéseire (tPA diffúziója az alvadékba, plazminogén aktiváció, fibrin oldása plazminnal).

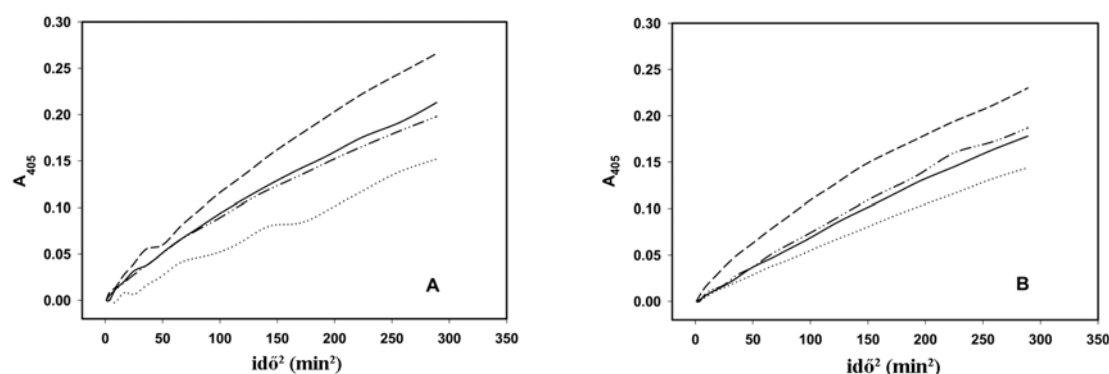
A normál plazmából izolált IgG valamint a „B” APS betegtől (enyhén emelkedett aCL titer) származó IgG tovább korlátozza a tPA penetrációját a foszfolipid tartalmú fibrinbe, míg az „F” beteg (magas aCL titer) IgG-jének főhatása és interakciója a foszfolipiddel nem szignifikáns kétszemponos ANOVA alapján (**65. ábra**). Ez a funkcióvesztés egyes APS IgG esetében hozzájárulhat a fibrinolitikus aktivitás variabilitásához az APS betegek körében.



65. ábra: Eu-tPA diffúziója a foszfolipideket és különböző IgG-ket tartalmazó fibrinhálóba. [XVIII]

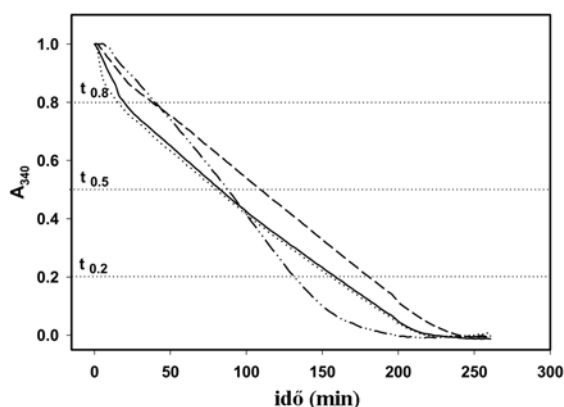
Foszfolipidet (0,5 g/l) és normál- (N-) vagy APS- (B-, F-) IgG-t (13 μ M) tartalmazó fibrinalvadék (7,35 μ M) felszínére Eu-tPA-t rétegeztünk rá (20 nM : 100%). 40 perc múlva a felszínt mostuk és a maradék, fibrinbe diffundált Eu-tPA fluoreszcenciáját mértük, és ebből a fibrinbe diffundált Eu-tPA %-os arányát számítottuk: átlagértékek (kis négyzetek), SD értékei (oszlopok) és a standard hiba értékei (nagy négyzetek) vannak feltüntetve. C2: IgG- és foszfolipid-mentes fibrin; C1: IgG-mentes, foszfolipid-tartalmú fibrin; N-, B-, F-IgG: a foszfolipid mellett az adott IgG-t is tartalmazó fibrin (N, normál; B- és F-, két APS betegtől származó). **Betét:** a főábrán bemutatott kísérletek kétszemponos varianciaanalízise alapján nyert p -értékek (hatáshiány valószínűsége). Mind a főhatások, mind az interakció szignifikancia szintjét $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg, *n.s.*, nem szignifikáns.

Mivel a foszfolipidhez hasonlóan az IgG-k sem befolyásolják a plazminogén aktivációját tPA-val oldatban (nem ábrázolt adatok), a két modulátor interakcióját csak fibrin felszínén zajló aktiváció során tudjuk vizsgálni (**66. ábra**). Az N-IgG mellett a plazminogén aktiváció lelassul foszfolipid-mentes és foszfolipid tartalmú fibrin felszínén is, ami összhangban áll a csökkent tPA-diffúzióval. A plazminogén aktivációra gyakorolt IgG hatások azonban nem korlátozódnak a tPA penetrációra. A „B” APS beteg IgG-je, amely az N-IgG-hez hasonlóan csökkenti a tPA mennyiségét a fibrinben, serkenti a plazminogén aktivációt. Mivel a B-IgG nem befolyásolja a plazminogén aktivációt fibrin hiányában, hatása talán a hármas tPA-fibrin-plazminogén komplexen keresztül érvényesül azáltal, hogy jelenlétében a komplex optimális konformációt vesz fel egy vékony felszíni rétegben, ahol a diffúziós viszonyok nem játszanak jelentős szerepet. Az N-IgG és a B-IgG hatásai függetlenek a foszfolipid jelenlététől. A kétszemponos ANOVA csak egy szignifikáns interakciót igazol a plazminogén aktivációban: az „F” APS betegtől származó IgG mérsékli a foszfolipidek gátló hatását ($p < 0.005$), ami a tPA penetráció vonatkozásában fent említett funkcióvesztésével hozható összefüggésbe.



66. ábra: Plazminogén aktiváció fibrin felszínén tPA hatására különböző típusú IgG-k jelenlétében. [XVIII]

Plazminogént ($0,1 \mu\text{M}$) és különböző típusú IgG-eket ($13 \mu\text{M}$) tartalmazó fibrint állítottunk elő foszfolipid nélkül (A) vagy 1 g/l foszfolipid tartalommal (B). A fibrin felszínére tPA-t (14 nM) és Spectrozyme-PL szubsztrátot rétegeztünk rá ($0,6 \text{ mM}$) és az abszorbanciát 405 nm -en (A_{405}) folyamatosan követtük 37°C -on. IgG-mentes kontroll: folytonos vonal; normál-IgG: pontozott vonal; B-IgG: szaggatott vonal; F-IgG: két ponttal szaggatott vonal.



67. ábra: Foszfolipidet és különböző típusú IgG-eket tartalmazó fibrin oldása plazmin hatására. [XVIII]

Foszfolipid (1 g/l) és IgG ($13 \mu\text{M}$) tartalmú fibrinre plazmint ($11,7 \mu\text{M}$) rétegeztünk rá, az abszorbanciát 340 nm -en követtük (A_{340}) és normalizált formában (elosztva a kezdeti A_{340} értékkel) ábráztuk. A $t_{0,8}$, $t_{0,5}$, $t_{0,2}$ lízisidők a kezdeti A_{340} érték 20, 50, ill. 80 %-nyi csökkenéséhez szükséges időt jelölik. IgG-mentes kontroll: folytonos vonal; normál- (N-) IgG: pontozott vonal; F-IgG: szaggatott vonal; B-IgG: két ponttal szaggatott vonal.

A foszfolipidek és az IgG interakcióit a fibrin plazminnal történő oldásában turbidimetriával vizsgáltuk (67. ábra). Az N-IgG nem módosította a foszfolipid által biztosított rezisztenciát a plazmin hatással szemben. Ugyanakkor mindkét APS IgG befolyásolja a foszfolipid tartalmú fibrin oldását, de eltérő módon. A fibrin a legjobban az F-IgG mellett tudott ellenállni a plazmin hatásnak, míg a B-IgG mellett csak a fibrinoldás kezdeti fázisa lassult le, későbbi stádiumban a lízis felgyorsul és a $t_{0,2}$ értéke az IgG-mentes fibrinhez képest is rövidebb. Mivel a foszfolipid és az APS IgG eltérő mechanizmussal gátolja a plazminnal indított fibrinolízist (a foszfolipid megköti a plazmint a 4.7.1 fejezetben leírtak szerint, az APS IgG-k pedig zavarják a plazmin és fibrin közötti

kölcsönhatást az e fejezet elején közölt adatok szerint), hatásuk szinergizmusa érthető a megnövelt rezisztencia esetében. A B-IgG jelenlétében fellépő késői gyorsulás viszont más mechanizmust is feltételez: a részlegesen fellazult fibrinszerkezetben egyes IgG-k leszoríthatják a foszfolipidhez kötött plazmint, így növelve a fibrinre hatni képes proteáz mennyiségét.

Az immunglobulinokkal végzett vizsgálatok gyakorlati oldalról közelítik meg a trombolízis enzimológiáját. A proteázhatások modulációjának feltérképezésével nemcsak egy klinikai szindróma változatos tüneteinek jobb megértését, de konkrét terápiás döntések meghozatalát is elősegítik, ahogy ezt az anti-trombin IgG példáján láttuk.

5. Következtetések, az új eredmények összefoglalása

Az értekezés az elmúlt 10 évben enzimológiai szinten végzett, a trombolízis-rezisztenciával kapcsolatos kutatásaink főbb eredményeit ismerteti. A legfontosabb megállapításaink az alábbiak szerint foglalhatók össze:

1. A szubsztrát, vagyis a fibrin szerkezetének oldaláról megközelítve a plazmin katalitikus hatékonyságának kérdését, bebizonyítottuk, hogy a finom szerkezetű, kis átmérőjű rostokból álló fibrinháló jobb szubsztrátja a proteáznak, amit később mások által végzett direkt szerkezeti vizsgálatok is alátámasztottak. A felszíni proteolízis analízisének általunk alkalmazott kinetikai modell előjelezte a plazmin processzivitását a polimerizált szubsztrát emésztésében, amely a későbbi szerkezeti bizonyítékok nyomán „crawling” mechanizmusként vonult be a szakirodalomba.

2. Az enzim, a plazmin oldaláról vizsgálva a katalitikus hatékonyságot, kimutattuk, hogy az 5. kringle szükséges a plazmin katalitikus doménje funkcionális konformációjának fenntartásához. Az azonos katalitikus, de eltérő számú kringle doménnel rendelkező plazmin-származékoknál a nem-kereszt kötött fibrinen mért k_{cat}/K_M arány csökken a kringle domének elvesztésével. Ugyanakkor a miniplazmin, amely csak az 5. kringle és katalitikus doménből áll, a leghatékonyabb proteáz kereszt kötött fibrinen, mert feltehetőleg kisebb molekulamérete kedvezőbb a kompaktabb szerkezetű kovalensen kereszt kötött fibrinhálóban.

3. Megfigyeltük, hogy amennyiben *in vivo* a PMN-elasztáz fokozott hatása érvényesül, a beteg plazmája nagyobb fibrinolitikus potenciállal rendelkezik, azaz a belőle készült alvadék gyorsabban oldódik tPA hatására. A jelenség hátterében a miniplazminogén keletkezését feltételezzük, amelyet a tPA gyorsabban aktivál és a keletkező miniplazmin az előzőekben tárgyalt hatékonysággal oldja a fibrint.

4. Perfúziós modellben tett megfigyeléseink szerint áramlás alatt már nemcsak az enzim proteolitikus hatékonysága határozza meg a fibrinoldás sebességét, hanem a termékek által létesített interakciók is. Plazminhoz képest PMN-elasztáz hatására nagyobb méretű fibrin degradációs termékek keletkeznek és ezek nem teszik lehetővé az alvadék szétesését még a közepes nagyságú artériákra jellemző hemodinamikai viszonyok között sem, szemben a plazmin mellett fellépő korai széteséssel. Ennek következtében az oldás lassabb, de *in vivo* trombolízis szempontjából a szétesés hiánya akár előnyös is lehet, mert nem rejti magában az embolizáció lehetőségét.

5. A protrombinnal és albuminnal végzett modellkísérleteink igazolják, hogy a fehérjék denaturálása során olyan szerkezeti átalakulások történnek, amelyek a tPA által

katalizált plazminogén aktivációban kofaktor tulajdonságként jelennek meg. Ezek közül két szerkezeti tényezőt sikerült azonosítanunk a kofaktor funkció hátterében: intermolekuláris interakciók β -redőzött lemezek között és a kofaktor aggregátumok 20 nm feletti átmérője.

6. Kimutattuk, hogy a metilglioxál, amelynek szintje emelkedik diabetes mellitusban, nem-enzimátikusan módosítja a plazminogént, aminek következtében aktivációja gátolt kofaktor hiányában. Az általunk leírt kovalens módosítás gyakorlati jelentősége abban rejlik, hogy a terápiás trombolízisnél olyan plazminogén aktivátorokat is alkalmaznak, amelyek hatásmechanizmusa nem igényel kofaktort (pl. streptokináz, urokináz). Így a terápiás válasz egészen változó lehet, amikor ezek a fibrinolitikus ágensek a beteg szervezetében esetleg módosított plazminogénre fejtik ki hatásukat.

7. Az artériás trombusokban miozin jelenlétét igazoltuk, amely a fibrinhez kötődik és stabilizálja szerkezetét oldással szemben azáltal, hogy lefedi a fibrin tPA-kofaktor funkciójáért felelős kötőhelyeket és alternatív szubsztrátként a plazminért verseng a fibrinnel. Bár a miozin önmagában is kofaktor a tPA által katalizált plazminogén aktivációban, ez a funkciója csak szabad formában érvényesül és nem a fibrin-miozin komplexben.

8. Új tényezőt azonosítottunk a vérlemezkék anti-fibrinolitikus funkciójában: fehérje-mentes membrán foszfolipidjei révén gátolják a plazminogén aktivációt és a plazmin hatást fibrinben. A foszfolipidek oldaláról e hatások két szerkezeti feltételhez köthetők: anionos poláros fej és alvadási ponthoz közeli membrán-állapot. A rendezett membrán képződés követelménye felveti annak lehetőségét, hogy a foszfolipidek kitöltik a fibrin-gél pórusait és így akadályozzák az exogén fehérjék penetrációját. Ugyanakkor közvetlenül kimutattuk, hogy a foszfolipidek nemcsak diffúziós gátat képeznek, hanem meg is kötik a fibrinolízisben szereplő egyes enzimeket.

9. Artériás trombusokban szabad zsírsavakat mutattunk ki egészen több száz mikromoláris értékig terjedő koncentrációban. Olajsavval modellezve a szabad zsírsavak hatását a fibrinolízisre, eredményeink alapján az a koncepció alakul ki, hogy a szabad zsírsavak jelenléte olyan tényező, amely a fibrin alvadékra lokalizálja a plazmin hatást úgy, hogy egyfelől felszínén serkentik a plazminogén aktivációt, másfelől a folyadék fázisban gátolják a plazmin aktivitást.

10. Vizsgálataink során két módszertani újdonságot vezettünk be, amelyek túlmutatnak a trombolízis *in vitro* tanulmányozásán és általános enzimológiai alkalmazásra is számíthatnak. A gél-fázisú fibrin felszínén zajló proteolízis jellemzésére olyan modellt alkalmaztunk, amelynek paraméterei információt szolgáltatnak a folyadék-fázisból támadó

enzim működéséről, és ez a megközelítés hasznosítható más heterogén fázisú enzimatis folyamatoknál is. A folyamatgörbe-analízist a számítástechnika mai fejlettségi szintjére hoztuk azáltal, hogy a Monte Carlo szimulációnak köszönhetően nemcsak a paraméterek becsült értékét, hanem a tényleges kísérleti bizonytalanságot tükröző statisztikai eloszlásukat is meghatározzuk.

11. Enzimológiai vizsgálataink gyakorlati alkalmazásaként az antifoszfolipid szindrómában előforduló immunglobulinok modulátor szerepét teszteltük a fibrinolízisben és megállapítottuk, hogy a betegektől származó IgG általában gátolja a fibrin oldását plazminnal. Továbbá olyan antitestet is azonosítottunk, amely vérplazma környezetben fenntartja a trombin aktivitást és a XIII-as faktor aktivációja útján hozzájárul a fibrin stabilizálásához.

Összefoglalva, az értekezésben ismertetett eredményekkel közelebb jutottunk a trombusok változó litikus érzékenységeinek megértéséhez. Azáltal, hogy hűen tükrözik az *in vivo* szituációt, a bevezetett kísérleti és matematikai modellek remélhetőleg hasznos *in vitro* eszközei lesznek új hatékony trombolitikus ágensek kifejlesztésének.

6. Köszönetnyilvánítás

Rendkívül hálás vagyok Machovich Raymund professzornak, aki egyetemi éveim óta atyai gondoskodással támogatja tudományos tevékenységemet, elsősorban azért a kutatói szemléletért és hozzáállásért, amit sajátmaga érvényesít a mindennapi munkában és tanítványainak is átad. Tőle tanultam teljes odaadással, hobbiként átélni a kutatómunkát, bátran akár képtelennek tűnő hipotéziseket felvetni és ezeket szigorúan, igényes kísérletekkel ellenőrizni. Az értekezésben bemutatott munka nagyrészen az ő ötletein alapul és kivétel nélkül minden eredmény megbeszélésének, kritikai értékelésének ő is részese volt.

Az ismertetett kísérletek (kevés kivétellel) a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetében kerültek kivitelezésre. Ehhez a munkához mindvégig élveztem az intézet igazgatóinak támogatását: a néhai Horváth István professzorét és az utóbbi 16 évben Ádám Veronika professzorasszonyét.

A bemutatott munka nemcsak az én érdemem, magában foglalja a hemosztázis laboratóriumban PhD fokozatot szerzett (vagy a megszerzés küszöbén álló) doktoranduszok hozzájárulását: Komorowicz Erzsébet, Váradi Balázs, Vörös Gábor, Gombás Judit, Rábai Gyöngyi, Tanka-Salamon Anna elsőszerzős cikkei jelzik részvételük súlyát. Külön kiemelném Léránt István kollégámnak és barátomnak mindennapi önzetlen erőfeszítéseit a közös munka sikerének érdekében. Szofisztikált kísérleteket csak megbízható rutin alapokra lehet építeni, ehhez pedig elengedhetetlen a technikai segítség, amit Himer Ágnestől, Horváth Györgynétől és az utóbbi 13 évben folyamatosan Oravec Györgytől kaptam.

A mai tudományban a kutatás sikeréhez eltérő területeken jártas szakemberek egyesített erőfeszítései szükségesek. Az én munkám során is több hazai és külföldi kollégával volt alkalmam együttműködni. Természetesen minden társszerzőm lényeges elemekkel gazdagította a közös munkát, de az együttműködés volumenét tekintve külön köszönet illeti Nagy Zoltán professzort és kutatócsoportját, és ezen belül Skopál Juditot. Külföldi partnereim közül Colin Longstaffot kell kiemelnem, akivel az utóbbi 6 évben folyamatosan együtt terveztünk, vitatkoztunk és nincs olyan eredményünk, amelynél egyikünk a másik véleményét, értékelését mellőzte volna, valamint Kiril Tenekedjiev, aki folyamatosan biztosítja munkánk matematikai hátterét.

Végül köszönetemet fejezem ki családomnak (szüleimnek, feleségemnek, fiamnak) azért a szerető légkörért, amely serkentően hatott alkotó-kutató munkámra, és a mindenkori megértésükért és biztatásukért.

7. Rövidítések jegyzéke

6AH, 6-aminohexanoát

aCL, kardiolipin elleni antitest

α_1 -PI, α_1 -proteáz inhibitor

α_2 -PI, α_2 -plazmin inhibitor

ADIFAB, akrilodannal jelölt, intesztinális zsírsavkötő fehérje (acrylodated intestinal fatty acid binding protein)

ANOVA, variancia analízis

APS, primer antifoszfolipid szindróma

B-IgG, „B” APS beteg vérplazmájából izolált immunglobulin G

BSA, bovin szérum albumin

DHPS, dihexanil-foszfadilszerin

FDP, fibrin degradációs termékek

FgDP, fibrinogén CNBr-hasítási termékei

F-IgG, „F” APS beteg vérplazmájából izolált immunglobulin G

FITC, fluoreszcein izotiocianát

F-XIIIa, aktivált XIII-as faktor

HSA, humán szérum albumin

ITC, izoterm titrálási kalorimetria

LUV, nagy unilamelláris vezikula

N-IgG, egészséges egyének vérplazmájából izolált immunglobulin G

PAI, plazminogén aktivátor inhibitor

PC, dipalmitil-foszfadilkolin

PCPS1:1, LUV, amelyben a PC és PS tömegaránya 1:1

PCPS3:1, LUV, amelyben a PC és PS tömegaránya 3:1

PLA₂, foszfolipáz A₂

pNA, *p*-nitroanilin

PMN, polimorfonukleáris leukocita

poPC, palmitil-oleil-foszfadilkolin

poPCPS, LUV, amelyben a poPC, PC és PS tömegaránya 2:3:5

poPCPS1:1, LUV, amelyben a poPC és PS tömegaránya 1:1

PS, dipalmitil-foszfadilszerin

SDS, Na-dodecilszulfát

SPR, surface plasmon resonance

tPA, szöveti típusú plazminogén aktivátor

8. Saját publikációk

8. 1. A kandidátusi fokozat megszerzése óta megjelent közlemények

(* levelezésért felelős szerző)

8.1.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Machovich R, Ajtai K, **Kolev K**, Owen WG. Myosin as cofactor and substrate in fibrinolysis. *FEBS Lett* 1997; 407: 93-96.
- II. **Kolev K**, Tenekedjiev K, Komorowicz E, Machovich R. Functional evaluation of the structural features of proteases and their substrate in fibrin surface degradation. *J Biol Chem* 1997; 272: 13666-13675.
- III. Komorowicz E, **Kolev K**, Léránt I, Machovich R. Flow-rate modulated dissolution of fibrin with clot-embedded and circulating proteases. *Circ Res* 1998; 82: 1102-1108
- IV. Komorowicz E, **Kolev K**, Machovich R. Fibrinolysis with des-kringle derivatives of plasmin and its modulation by plasma protease inhibitors. *Biochemistry* 1998; 37: 9112-9118.
- V. Machovich R, Komorowicz E, **Kolev K**, Owen WG. Facilitation of plasminogen activation by denatured prothrombin. *Thromb Res* 1999; 94: 389-394.
- VI. Léránt I, **Kolev K**, Gombás J, Machovich R. Modulation of plasminogen activation and plasmin activity by methylglyoxal modification of the zymogen. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1480: 311-320.
- VII. **Kolev K**, Gombás J, Váradi B, Skopál J, Mede K, Pitlik E, Nagy Z, Machovich R. Immunoglobulin G from patients with antiphospholipid syndrome impairs the fibrin dissolution with plasmin. *Thromb Haemost* 2002; 87: 502-508.
- VIII. **Kolev K**, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89: 610-621.
- IX. **Kolev K**, Tenekedjiev K, Ajtai K, Kovalszky I, Gombás J, Váradi B, Machovich R. Myosin: a non-covalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood* 2003; 101: 4380-4386.
- X. Váradi B, **Kolev K***, Tenekedjiev K, Mészáros G, Kovalszky I, Longstaff C, Machovich R. Phospholipid-barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gel-phase crystalline structure. *J Biol Chem* 2004; 279: 39863-39871.
- XI. Gombás J, **Kolev K***, Tarján E, Machovich R. Impaired fibrinolytic potential related to elevated α_1 -proteinase inhibitor levels in patients with pulmonary thromboembolism. *Ann Hematol* 2004; 83: 759-763.

- XII. **Kolev K***, Léránt I, Skopál J, Kelemen A, Nagy Z, Machovich R. Impaired inactivation by antithrombin and hirudin and preserved fibrinogen-clotting activity of thrombin in complex with anti-thrombin antibody from a patient with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 94: 82-87.
- XIII. **Kolev K***, Longstaff C, Machovich R. Fibrinolysis at the fluid-solid interface of thrombi. *Curr Medic Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 341-355.
- XIV. Váradi B, **Kolev K.*** Foszfolipid-fehérje kölcsönhatások az artériás trombusok fibrinolitikus rezisztenciájának hátterében. *Biokémia* 2005; 29: 26-31.
- XV. Galántai R, Módos K, Fidy J, **Kolev K***, Machovich, R. Structural basis of the cofactor function of denatured albumin in plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 341: 736-741.
- XVI. Tenekedjiev K, Váradi B, **Kolev K.** Identification of the kinetic parameters of a protease in the dissolution of fibrin-myosin clots. *C R Acad Bulgare Sci* 2006; 59: 1067-1074.
- XVII. Rábai G, Váradi B, Longstaff C, Sótonyi P, Kristóf V, Timár F, Machovich R, **Kolev K.*** Fibrinolysis in a lipid environment: modulation through release of free fatty acids. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1265-1273.
- XVIII. Gombás J, Tanka-Salamon A, Skopál J, Nagy Z, Machovich R, **Kolev K.*** Modulation of fibrinolysis by the combined action of phospholipids and immunoglobulins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 82-88.
- XIX. Tanka-Salamon A, Tenekedjiev K, Machovich R, **Kolev K.*** Suppressed catalytic efficiency of plasmin in the presence of long-chain fatty acids. Identification of kinetic parameters from continuous enzymatic assay with Monte Carlo simulation. *FEBS J* 2008; 275: doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06288.x

8.1.2. Az értekezésben nem tárgyalt közlemények

- XX. Nagy Z, Vastag M, Skopál J, **Kolev K**, Machovich R, Karádi I, Tóth M. Human brain microvessel endothelial cell culture as a model system to study vascular factors of ischemic stroke. *Keio J Med* 1996; 45: 200-206.
- XXI. Vastag M, Skopál J, Kramer J, **Kolev K**, Vokó Z, Csonka É, Machovich R, Nagy Z. Endothelial cells cultured from human brain microvessel produce complement proteins factor H, factor B, C1 inhibitor and C4. *Immunobiology* 1998; 199: 5-13.
- XXII. Nagy Z, **Kolev K**, Csonka É, Vastag M, Machovich R. Perturbation of the integrity of the blood-brain barrier by fibrinolytic enzymes. *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9: 471-478.

- XXIII. Skopál J, Vastag M, Varga L, **Kolev K**, Szegedi N, Mede K, Machovich R, Nagy Z, Kramer J. Streptokinase does not activate the complement system. *Blood Coagul Fibrinol* 2000; 11: 617-622.
- XXIV. Vörös G, **Kolev K***, Csomor K, Machovich R. Inhibition of plasmin activity by sulfated polyvinylalcohol-acrylate copolymers. *Thromb Res* 2000; 100: 353-361.
- XXV. **Kolev K**, Skopál J, Nagy Z, Machovich R. Is the streptokinase responsible for the endothelial injury and the platelet activation during fibrinolytic therapy? *J Intern Med* 2001; 249: 475-476.
- XXVI. Tenekedjiev K, **Kolev K.*** Introduction to interpretation of stochastic parameters: Computer-intensive procedures for evaluation of data in enzyme kinetics. *Biochem Mol Biol Education* 2002; 30: 414-418.
- XXVII. **Kolev K**, Skopál J, Simon L, Csonka É, Machovich R, Nagy Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in post-hypoxic human brain capillary endothelial cells: H₂O₂ as a trigger and NF-κB as a signal transducer. *Thromb Haemost* 2003; 90: 528-537.
- XXVIII. Nagy Z, Vastag M, **Kolev K**, Karádi I, Skopál J. Human cerebral microvessel endothelial cell culture as a model system to study the blood-brain interface in ischemic/hypoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 201-210.

8.2. A kandidátusi fokozat megszerzése előtt megjelent közlemények

- XXIX. Bartha K, Kovács T, Léránt I, Papp B, Csonka É, **Kolev K**, Machovich R. Interaction of antithrombin III and thrombin-antithrombin III complex with cultured aortic endothelial cells. *Thromb Res* 1987; 47: 541-552.
- XXX. **Kolev K**, Léránt I, Tenekejiev K, Machovich R. Regulation of the fibrinolytic activity of neutrophil leukocyte elastase, plasmin and miniplasmin by plasma protease inhibitors. *J Biol Chem* 1994; 269: 17030-17034.
- XXXI. **Kolev K**, Komorowicz E, Machovich R. Heparin modulation of the fibrinolytic activity of plasmin, miniplasmin and neutrophil leukocyte elastase in the presence of plasma protease inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 905-911.
- XXXII. Nagy Z, **Kolev K**, Csonka É, Pék M, Machovich R. Contraction of human brain endothelial cells induced by thrombogenic and fibrinolytic factors. An *in vitro* cell culture model. *Stroke* 1995; 26: 265-270.
- XXXIII. **Kolev K**, Owen WG, Machovich R. Dual effect of synthetic plasmin substrates on plasminogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1247: 239-245.

- XXXIV. **Kolev K**, Komorowicz E, Owen WG, Machovich R. Quantitative comparison of fibrin degradation with plasmin, miniplasmin, neutrophil leukocyte elastase and cathepsin G. *Thromb Haemost* 1996; 75: 140-146.

A saját publikációk szcientometriai adatai

Megjelenés időpontja	Összes közlemény			Első, utolsó vagy levelező szerzős cikk		
	db.	IF	független idézet	db.	IF	független idézet
Kandidátusi fokozat után	28	81,61	236	18	56,17	113
Kandidátusi fokozat előtt	6	21,48	99	4	16,12	63
Összesen	34	103,09	335	22	72,29	176

9. Irodalom

1. The World Health Report 2004. WHO <http://www.who.int/whr/2004/annex/en/StatisticalAnnex> pp. 120-125.
2. de Boer MJ, Zijlstra F. Treating myocardial infarction in the post-GUSTO era. A European perspective. *Pharmacoeconomics*. 1997;12:427-437.
3. Baker WF. Thrombolytic therapy: current clinical practice. *Hematol Oncol Clin N* 2005; 19: 147-181.
4. Verstraete M. Overview of new therapeutic agents. In: *New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis* (Sasahara, A.A., and Loscalzo, J.L., eds), Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 2003, pp. 477-478.
5. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-3124.
6. Yang Z, Kollman JM, Pandi L, Doolittle RF. Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution. *Biochemistry* 2001; 40: 12515-12523.
7. Everse SJ, Spraggon G, Veerapandian L, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry* 1998; 37: 8637-8642.
8. Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* 1997; 389: 455-462.
9. Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 85-90.
10. Blomback B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110.
11. Baradet TC, Haselgrove JC, Weisel JW. Three-dimensional reconstruction of fibrin clot networks from stereoscopic intermediate voltage electron microscope images and analysis of branching. *Biophys J* 1995; 68: 1551-1560.
12. Carr ME Jr, Hermans J. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules* 1978; 11: 46-50.
13. Voter WA, Lucaveche C, Blaurock A, Erickson HP. Lateral packing of protofibrils in fibrin fibers and fibrinogen polymers. *Biopolymers* 1986; 25: 2359-2373.
14. Guthold M, Liu W, Stephens B, Lord ST, Hantgan RR, Erie DA, Taylor Jr RM, Superfine R. Visualization and mechanical manipulations of individual fibrin fibers suggest that fiber cross section has fractal dimension 1.3. *Biophys J* 2004; 87: 4226-4236.
15. Rellick LM, Becktel WJ. Molecular volume. *Meth Enzymol* 1995; 259: 377-395.
16. Matveyev MY, Domogatsky SP. Penetration of macromolecules into contracted blood clot. *Biophys J* 1992; 63: 862-863.
17. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. Fibrin in human plasma: gel architecture governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res* 1994; 75: 521-538.
18. Gruber A, Mori E, del Zoppo GJ, Waxman L, Griffin JH. Alteration of fibrin network by activated protein C. *Blood* 1994; 83: 2541-2548.
19. Minton AP. The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem* 1983; 55: 119-140.
20. Rivas G, Fernandez JA, Minton AP. Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry* 1999; 38: 9379-9388.

21. Torbet J. Fibrin assembly in human plasma and fibrinogen/albumin mixtures. *Biochemistry* 1986; 25: 5309-5314.
22. Galanakis DK, Lane BP, Simon SR. Albumin modulates lateral assembly of fibrin polymers: evidence of enhanced fine fibril formation and of unique synergism with fibrinogen. *Biochemistry* 1987; 26: 2389-2400.
23. Coleman M, Vigliano EM, Weksler ME, Nachman RL. Inhibition of fibrin monomer polymerization by lambda myeloma globulins. *Blood* 1972; 39: 210-223.
24. Gabriel DA, Smith LA, Folds JD, Davis L, Cancelosi SE. The influence of immunoglobulin (IgG) on the assembly of fibrin gels. *J Lab Clin Med* 1983; 1: 545-552.
25. Carr ME, Zekert SL. Abnormal clot retraction, altered fibrin structure, and normal platelet function in multiple myeloma. *Am J Physiol* 1994; 266: H1195-H1201.
26. O'Kane MJ, Wisdom GB, Desai ZR, Archbold GPR. Inhibition of fibrin monomer polymerisation by myeloma immunoglobulin. *J Clin Pathol* 1994; 47: 266-268.
27. Carr ME, Dent RM, Carr SL. Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 83-88.
28. London M. Non-covalent associations of proteins in plasma: self-, mixed fibrin(ogen), mixed protein-non-protein association. *Clin Biochem* 1997; 30: 83-89.
29. Gaffney PJ, Whitaker AN. Fibrin crosslinks and lysis rates. *Thromb Res* 1979; 14: 85-94.
30. Francis CW, Marder VJ, Martin SE. Plasmic degradation of crosslinked fibrin. I. Structural analysis of the particulate clot and identification of new macromolecular-soluble complexes. *Blood* 1980; 56: 456-464.
31. Siebenlist KR, Mosesson MW. Progressive cross-linking of fibrin γ chains increases resistance to fibrinolysis. *J Biol Chem* 1994; 269: 28414-28419.
32. Hevessy Z, Haramura G, Boda Z, Udvardy M, Muszbek L. Promotion of the crosslinking of fibrin and α_2 -antiplasmin by platelets. *Thromb Haemost* 1996; 75: 161-167.
33. Collet JP, Montalescot J, Lesty C, Weisel JW. A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots. *Circ Res* 2002; 90: 428-434.
34. Marshall JM, Brown AJ, Ponting CP. Conformational studies of human plasminogen and plasminogen fragments: evidence for a novel third conformation of plasminogen. *Biochemistry* 1994; 33: 3599-3606.
35. Cockell CS, Marshall JM, Dawson KM, Cederholm-Williams SA, Ponting CP. Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem J* 1998; 333: 99-105.
36. Chibber BAK, Castellino FJ. Regulation of the streptokinase-mediated activation of human plasminogen by fibrinogen and chloride ions. *J Biol Chem* 1986; 261: 5289-5295.
37. Ramakrishnan V, Patthy L, Mangel WF. Conformation of Lys-plasminogen and the kringle 1-3 fragment of plasminogen analyzed by small-angle neutron scattering. *Biochemistry* 1991; 30: 3963-3969.
38. Bányai L, Patthy L. Importance of intramolecular interactions in the control of the fibrin affinity and activation of human plasminogen. *J Biol Chem* 1984; 259: 6466-6471.
39. Vali Z, Patthy L. Location of the intermediate and high affinity omega-aminocarboxylic acid-binding sites in human plasminogen. *J Biol Chem* 1982; 257: 2104-2110.

40. Trexler M, Váli Z, Patthy L. Structure of the omega-aminocarboxylic acid-binding sites of human plasminogen. Arginine 70 and aspartic acid 56 are essential for binding of ligand by kringle 4. *J Biol Chem* 1982; 257: 7401-7406.
41. Patthy L, Trexler M, Váli Z, Bányai L, Váradi A. Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS Lett* 1984; 171: 131-136.
42. Váli Z, Patthy L. The fibrin-binding site of human plasminogen. Arginines 32 and 34 are essential for fibrin affinity of the kringle 1 domain. *J Biol Chem* 1984; 259: 13690-13694.
43. Thorsen S, Clemmensen I, Sottrup-Jensen L, Magnusson S. Adsorption to fibrin of native fragments of known primary structure from human plasminogen. *Biochim Biophys Acta* 1981; 668: 377-387.
44. Wu HL, Chang BI, Wu DH, Chang LC, Gong CC, Lou KL, Shi GY. Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *J Biol Chem* 1990; 265: 19658-19664.
45. Christensen U. The AH-site of plasminogen and two C-terminal fragments. A weak lysine-binding site preferring ligands not carrying a free carboxylate function. *Biochem J* 1984; 223: 413 – 421.
46. Suenson E, Lützen O, Thorsen S. Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur J Biochem* 1984; 140: 513 – 522.
47. Fleury V, Angles – Cano E. Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry* 1991; 30: 7630 – 7638.
48. Mangel WF, Lin B, Ramakrishnan V. Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. *Science* 1990; 248: 69-73.
49. Sinniger V, Merton RE, Fabregas P, Felez J, Longstaff C. Regulation of tissue plasminogen activator activity by cells - domains responsible for binding and mechanism of stimulation. *J Biol Chem* 1999; 274: 12414-12422.
50. Ferguson EW, Fretto LJ, McKee PA. A re-examination of the cleavage of fibrinogen and fibrin by plasmin. *J Biol Chem* 1975; 250: 7210-7218.
51. Walker JB, Nesheim ME. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *J Biol Chem* 1999; 274: 5201-5212.
52. Novokhatny VV, Kudinov SA, Privalov PL. Domains in human plasminogen. *J Mol Biol* 1984; 179: 215 – 232.
53. Robbie LA, Bennett B, Croll AM, Brown PAJ, Booth NA. Proteins of the fibrinolytic system in human thrombi. *Thromb Haemostasis* 1996; 75: 127-133.
54. Francis CW, Marder VJ. Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW (eds.), *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1994: 1076-1103.
55. Bachmann F. The plasminogen-plasmin enzyme system. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW (eds.), *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1994: 1592-1622.
56. van Zonneveld AJ, Veerman H, Pannekoek H. On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. *J Biol Chem* 1986; 261: 14214-14218.
57. Verheijen JH, Caspers MP, Chang GT, de Munk GA, Pouwels PH, Enger-Valk BE. Involvement of finger domain and kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator in fibrin binding and stimulation of activity by fibrin. *EMBO J* 1986; 5: 3525-3530.

58. Yakovlev S, Makogonenko E, Kurochkina N, Nieuwenhuizen W, Ingham K, Medved L. Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry* 2000; 39: 15730-15741.
59. Horrevoets AJG, Smilde A, de Vries C, Pannekoek H. The specific roles of finger and kringle 2 domains of tissue-type plasminogen activator during in vitro fibrinolysis. *J Biol Chem* 1994; 269: 12639-12644.
60. Camiolo SM, Thorsen S, Astrup T. Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin, and plasmin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 138: 277-280.
61. Thorsen S. The mechanism of plasminogen activation and the variability of the fibrin effector during tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis. *Ann New York Acad Sci* 1992; 667: 52-63.
62. Nieuwenhuizen W. Fibrin-mediated plasminogen activation. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936: 237-246.
63. Kohnert U, Horsch B, Fischer S. A variant of tissue-plasminogen activator (tPA) comprised of the kringle-2 and the protease domain shows a significant difference in the in-vitro rate of plasmin formation as compared to the recombinant human tPA from transformed Chinese hamster ovary cells. *Fibrinolysis* 1993; 7: 365-372.
64. Smalling RW, Bode C, Kalbfleisch JSS, Limbourg P, Forycki F, Habib G, Feldman R, Hohnloser S, Seals A and the RAPID investigators. Coronary heart disease/myocardial infarction: more rapid, complete, and stable coronary thrombolysis with bolus administration of reteplase compared with alteplase infusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 91: 2725-2732.
65. Darras V, Thienpont M, Stump DC, Collen D. Measurement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies. *Thromb Haemost* 1986; 56: 411 – 417.
66. Longstaff C, Gaffney PJ. Serpin-serine protease binding kinetics: α_2 -antiplasmin as a model inhibitor. *Biochemistry* 1991; 30: 979-986.
67. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 655-709.
68. Mimuro J, Koike Y, Sumi Y, Aoki N. Monoclonal antibodies to discrete regions in α_2 -plasmin inhibitor. *Blood* 1987; 69: 446-453.
69. Sakata Y, Aoki N. Crosslinking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin by fibrin stabilising factor. *J Clin Invest* 1980; 65: 290-297.
70. Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol* 1988; 70: 327-333.
71. Fay WP, Eitzman DT, Shapiro AD, Madison EL, Ginsburg D. Platelets inhibit fibrinolysis in vitro by both plasminogen activator inhibitor-1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 1994; 83: 351-356.
72. Ritchie H, Robbie LA, Kinghorn S, Exley R, Booth NA. Monocyte plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) inhibits u-PA-mediated fibrin clot lysis and is cross-linked to fibrin. *Thromb Haemost* 1999; 81: 96-103.
73. Ritchie H, Lawrie LC, Crombie PW, Mosesson MW, Booth NA. Cross-linking of plasminogen activator inhibitor 2 and α_2 -antiplasmin to fibrin(ogen). *J Biol Chem* 2000; 275: 24915-24920.
74. Bok RA, Mangel WF. Quantitative characterization of the binding of plasminogen to intact fibrin clots, lysine-sepharose, and fibrin cleaved by plasmin. *Biochemistry* 1985; 24: 3279 – 3286.
75. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetic of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982; 257: 2912-2919.

76. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270: 14477-14484.
77. Blinc A, Planinsic G, Keber D, Jarh O, Lahajnar G, Zidansek A, Demsar F. Dependence of blood clot lysis on the mode of transport of urokinase into the clot – a magnetic resonance imaging study in vitro. *Thromb Haemost* 1991; 65: 549-552.
78. Diamond SL, Anand S. Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis. *Biophys J* 1993; 65: 2622-2643.
79. Wu JH, Siddiqui K, Diamond SL. Transport phenomena and clot dissolving therapy: an experimental investigation of diffusion-controlled and permeation-enhanced fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1994; 72: 105-112.
80. Sakharov DV, Rijken DC. Superficial accumulation of plasminogen during plasma clot lysis. *Circulation* 1995; 92: 1883-1890.
81. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997; 89: 1270-1278.
82. Rainger GE, Rowley AF, Nash GB. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: specificity of different chemotactic agents. *Blood* 1998; 92: 4819-4827.
83. Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF, Collen D. Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 1995; 9: 2585-2593.
84. Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL. Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev* 1995; 9: 794-807.
85. Zeng B, Bruce D, Kril J, Ploplis V, Freedman B, Brieger D. Influences of plasminogen deficiency on the contribution of polymorphonuclear leukocytes to fibrin/ogenolysis. Studies in plasminogen knock-out mice. *Thromb Haemost* 2002; 88: 805-810.
86. Barnhart MI. Importance of neutrophilic leukocytes in the resolution of fibrin. *Fed Proc* 1965; 24: 846-853.
87. Moroz LA. Nonplasmin-mediated fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 1984; 10: 80-86.
88. Imamura T, Kaneda H, Nakamura S. New functions of neutrophils in the Arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest* 2002; 82: 1287-1295.
89. Hajjar KA, Deora A. New concepts in fibrinolysis and angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2: 417-421.
90. Machovich R, Owen WG. The elastase-mediated pathway of fibrinolysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990; 1: 79-90.
91. Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zagdel M, Peterson TE, Magnusson S. The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one mini-plasminogen by elastase-catalyzed specific limited proteolysis. In: *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*. Davidson JF, Rowan RM, Samama MM, Desnoyers PC, eds. Raven Press 1978; Vol III: 191-209.
92. Machovich R, Owen WG. An elastase-dependent pathway of plasminogen activation. *Biochemistry* 1989; 28: 4517-4522.
93. Brower MS, Harpel PC. Proteolytic cleavage and inactivation of α_2 -plasmin inhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* 1982; 257: 9849-9854.
94. Shieh BH, Travis J. The reactive site of human α_2 -antiplasmin. *J Biol Chem* 1987; 262: 6055-6059.
95. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 15957-15960.

96. Carr ME, Gabriel DA. The effect of dextran 70 on the structure of plasma-derived fibrin gels. *J Lab Clin Med* 1980; 96: 985-993.
97. Jones AJS, Meunier AM. A precise and rapid microtitre plate clot lysis assay: methodology, kinetic modeling and measurement of catalytic constants for plasminogen activation during fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1990; 64: 455-463.
98. Carr ME Jr, Powers PL, Jones MR. Effects of poloxamer 188 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. *Thromb Haemost* 1991; 66: 565-568.
99. Nishino N, Kakkar VV, Scully MF. Influence of intrinsic and extrinsic plasminogen upon the lysis of thrombi in vitro. *Thromb Haemost* 1991; 66: 672-677.
100. Carr ME Jr, Krishnamurti C, Alving BM. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 on tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1992; 67: 106-110.
101. Longstaff C, Whitton CM. A proposed reference method for plasminogen activators that enables calculation of enzyme activities in SI units. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1416-1421.
102. Ranby M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* 1982; 704: 461-469.
103. Morrison M. Lactoperoxidase-catalyzed iodination as a tool for investigation of proteins. *Methods Enzymol* 1980; 70: 214-220.
104. Inglese J, Samama P, Patel S, Burbaum J, Stroke IL, Appel KC. Chemokine receptor-ligand interactions measured using time-resolved fluorescence. *Biochemistry* 1998; 37: 2372-2377.
105. Johnson ML, Frasier SG. Nonlinear least-squares analysis. *Methods Enzymol* 1985; 117: 301-342.
106. Johnson ML. Analysis of ligand-binding data with experimental uncertainties in independent variables. *Methods Enzymol* 1992; 210: 106-117.
107. Straume M, Johnson ML. Monte Carlo method for determining complete confidence probability distributions of estimated model parameters. *Methods Enzymol* 1992; 210: 117-129.
108. O'Shannessy DJ, Brigham-Burk M, Soneson KK, Hensley P, Brooks I. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions by surface plasmon resonance. *Methods Enzymol* 1994; 240: 323-349.
109. Fisher HF, Singh N. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol* 1995; 259: 194-221.
110. Indyk L, Fisher HF. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol* 1998; 295: 350-364.
111. Smith JL. On the simultaneous staining of natural fat and fatty acid by oxazine dyes. *J Pathol Bacteriol* 1908; 12: 1-4.
112. Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. The measurement of free fatty acid concentration with the fluorescent probe ADIFAB: a practical guide for the use of the ADIFAB probe. *Mol Cell Biochem* 1999; 192: 87-94.
113. Politis DN. Computer-intensive methods in statistical analysis. *IEEE Signal Proc Mag* 1998; 15: 39-55.
114. Collet JP, Lesty C, Montalescot G, Weisel JW. Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem* 2003; 278: 21331-21335.
115. Tinker DO, Low R, Lucassen M. Heterogeneous catalysis by phospholipase A2: mechanism of hydrolysis of gel phase phosphatidylcholine. *Can J Biochem* 1980; 58: 898-912.
116. Henis YI, Yaron T, Lamed R, Rishpon J, Sahar E, Katchalski-Katzir E. Mobility of enzymes on insoluble substrates: the beta-amylase-starch gel system. *Biopolymers* 1988; 27: 123-138.

117. Teasdale RD, Carr AR, Read RS. Substrate aggregation and cooperative enzyme kinetics: consideration of enzyme access with large aggregates. *J Theor Biol* 1985 7; 114: 375-382.
118. Wang D, Gou SY, Axelrod D. Reaction rate enhancement by surface diffusion of adsorbates. *Biophys Chem* 1992; 43: 117-137.
119. Axelrod D, Wang MD. Reduction-of-dimensionality kinetics at reaction-limited cell surface receptors. *Biophys J* 1994; 66: 588-600.
120. Gaspers PB, Gast AP, Robertson CR. Enzymes on immobilized substrate surfaces: Reaction. *J Coll Interface Sci* 1995; 172: 518-529.
121. Carman GM, Deems RA, Dennis EA. Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem* 1995; 270: 18711-18714.
122. Anand S, Wu JH, Diamond SL. Enzyme-mediated proteolysis of fibrous biopolymers: Dissolution front movement in fibrin or collagen under conditions of diffusive or convective transport. *Biotechnol Bioengin* 1995; 48: 89-107.
123. Morris JP, Blatt S, Powell JR, Strickland DK, Castellino FJ. Role of lysine binding regions in the kinetic properties of human plasmin. *Biochemistry* 1981; 20: 4811-4816.
124. Morris JP, Castellino FJ. The role of the lysine binding sites of human plasmin in the hydrolysis of human fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1983; 744: 99-104.
125. Vindigni A, Di Cera E. Release of fibrinopeptides by the slow and fast forms of thrombin. *Biochemistry* 1996; 35: 4417-4426.
126. Veklich Y, Francis CW, White J, Weisel JW. Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. *Blood* 1998; 92: 4721-4729.
127. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, Weisel JW. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-1361.
128. Weisel JW, Litvinov RI. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; *in press*
129. Weisel JW, Veklich Y, Collet JP, Francis CW. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 1999; 82: 277-282.
130. Gruber A, Mori E, del Zoppo GJ, Waxman L, Griffin JH. Alteration of fibrin network by activated protein C. *Blood* 1994; 83: 2541-2548.
131. Lewis MS, Carmassi F, Chung SI. Cooperative association of plasminogen with fibrinogen. *Biochemistry* 1984; 23: 3874-3879.
132. Lasters I, Van Herzele N, Lijnen HR, Collen D, Jespers L. Enzymatic properties of phage-displayed fragments of human plasminogen. *Eur J Biochem* 1997; 244: 946-952.
133. Turitto VT, Baumgartner HR. Initial deposition of platelets and fibrin on vascular surfaces in flowing blood. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW (eds.), *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1994: 805-822.
134. Mann KG. Prothrombin and thrombin. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW (eds.), *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1994: 184-199.
135. Machovich R, Owen WG. 6-aminohexanoate and chloride ion in the activation by urokinase of porcine plasminogens. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1040: 109-111.
136. Machovich R, Litwiller RD, Owen WG. Requirement of zymogen modification for activation of porcine plasminogen. *Biochemistry* 1992; 31: 11558-11561.
137. Machovich R, Owen WG. Denatured proteins as cofactors for plasminogen activation. *Arch Biochem Biophys* 1997; 344: 343-349.

138. Wetzel R, Becker M, Behlke J, Billwitz H, Böhm S, Ebert B, Hamann H, Krumbiegel J, Lassmann G. Temperature behavior of human serum albumin. *Eur J Biochem* 1980; 104: 469-478.
139. Fukuoka M, Kobayashi T, Satoh T, Tanaka A, Kubodera A. Studies of quality control of ^{99m}Tc-labelled macroaggregated albumin. Part 1: aggregation of non-mercaptalbumin and its conformation. *Nucl Med Biol* 1993; 20: 643-648.
140. Pico GA. Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *Int J Biol Macromol* 1997; 20: 63-73.
141. Kranenburg O, Bouma B, Kroon-Batenburg LMG, Reijerkerk A, Wu YP, Voest EE, Gebbink MFBG. Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross- β structure receptor. *Curr Biol* 2002; 12: 1833-1839.
142. Bouma B, Kroon-Batenburg LMG, Wu YP, Brunjes B, Posthuma G, Kranenburg O, de Groot PG, Voest EE, Gebbink MFBG. Glycation induces cross- β structure in albumin. *J Biol Chem* 2003; 278: 41810-41819.
143. Horwitz J. α -Crystallin. *Exp Eye Res* 2003; 76: 145-153.
144. Farnsworth PN, Frauwirth H, Groth-Vasselli B, Kamalendra S. Refinement of 3D structure of bovine lens α -crystallin. *Int J Biol Macromol* 1998; 22: 175-185.
145. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003; 89: 409-419.
146. LeVine III H. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol* 1999; 309: 274-284.
147. Vander Jagt DL, Robinson B, Taylor KK, Hunsaker LA. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* 1992; 267: 4364-4369.
148. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J, Barnett AH. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1989; 7: 115-120.
149. Richard JP. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 549-553.
150. Schott D, Dempfle CE, Beck P, Liermann A, Mohr-Pennert A, Goldner M, Mehlem P, Azuma H, Schuster V, Mingers AM, Schwarz HP, Kramer MD. Therapy with a purified plasminogen concentrate in an infant with ligneous conjunctivitis and homozygous plasminogen deficiency. *N Engl J Med* 1998; 339: 1679-1686.
151. Westwood ME, McLellan AC, Thornalley PJ. Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin. Competition with advanced glycation end product-modified serum albumin at the advanced glycation end product receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 32293-32298.
152. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with $N\alpha$ -acetylarginine, $N\alpha$ -acetylcysteine, and $N\alpha$ -acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 1994; 269: 32299-32305.
153. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys* 1997; 344: 29-36.
154. McBane II RD, Ford MAP, Karnicki K, Stewart M, Owen WG. Fibrinogen, fibrin and crosslinking in aging arterial thrombi. *Thromb Haemost* 2000; 84: 83-87.
155. Daniel JL. Platelet contractile proteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia, Pennsylvania: J.B. Lippincott Co; 1994: 557-573.
156. Casella JF, Masiello NC, Lin S, Bell W, Zucker MB. Identification of fibrinogen derivatives in the Triton-insoluble residue of human blood platelets. *Cell Motil* 1983; 3: 21-30.

157. Tanaka K, Onji T, Okamoto K, Matsusaka T, Taniguchi H, Shibata N. Reorganization of contractile elements in the platelet during clot retraction. *J Ultrastr Res* 1984; 89: 98-109.
158. Laudano AP, Doolittle RF. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, number of binding sites, and species differences. *Biochemistry* 1980; 19: 1013-1019.
159. Koretz JF. Hybridization and reconstitution of thick-filament structure. *Meth Enzymol* 1982; 85: 20-55.
160. Ohlson S, Strandh M, Nilshans H. Detection and characterization of weak affinity antibody antigen recognition with biomolecular interaction analysis. *J Mol Recogn* 1997; 10: 135-138.
161. Strandh M, Persson B, Roos H, Ohlson S. Studies of interactions with weak affinities and low-molecular-weight compounds using surface plasmon resonance technology. *J Mol Recogn* 1998; 11: 188-190.
162. Lewis SD, Shields PP, Shafer JA. Characterization of the kinetic pathway for liberation of fibrinopeptides during assembly of fibrin. *J Biol Chem* 1985; 260: 10192-10199.
163. Skarlatos SI, Rao R, Dickens BF, Kruth HS. Phospholipid loss in dying platelets. *Virchows Arch* 1993; 64: 241-245.
164. Schick PK. Megakaryocyte and platelet lipids. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW (eds.), *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1994: 574-589.
165. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121-1132.
166. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progr Lipid Res* 2003; 42: 423-438.
167. Cook BC, Retzinger GS. Lipid microenvironment influences the processivity of adsorbed fibrin(ogen): enzymatic processing and adhesivity of the bound protein. *J Coll Interface Sci* 1994; 162: 171-181.
168. Günther A, Bleyl H, Seeger W. Apoprotein-based synthetic surfactants inhibit cleavage of fibrinogen in vitro. *Am J Physiol* 1993; 265: L186-L192.
169. Günther A, Kalinowski M, Elssner A, Seeger W. Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity. *Am J Physiol* 1994; 267: L618-L624.
170. Lambers JWJ, Cammenga M, König BW, Mertens K, Pannekoek H, van Mourik JA. Activation of human endothelial cell-type plasminogen activator inhibitor (PAI-1) by negatively charged phospholipids. *J Biol Chem* 1987; 262: 17492-17496.
171. Jang IK, Gold HK, Ziskind AA, Fallon JT, Holt RE, Leinbach RC, May JW, Collen D. Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation* 1989; 79: 920-928.
172. Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol* 1988; 70: 327-333.
173. Fay WP, Eitzman DT, Shapiro AD, Madison EL, Ginsburg D. Platelets inhibit fibrinolysis in vitro by both plasminogen activator inhibitor-1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 1994; 83: 351-356.
174. Luna EJ, McConnel HM. Lateral phase separations in binary mixtures of phospholipids having different charges and different crystalline structures. *Biochim Biophys Acta* 1977; 470: 303-316.
175. Crowe JH, Tablin F, Tsvetkova N, Oliver AE, Walker N, Crowe LM. Are lipid phase transitions responsible for chilling damage in human platelets? *Cryobiology* 1999; 38: 180-191.

176. Lee AG. Lipid phase transitions and phase diagrams. *Biochim Biophys Acta* 1977; 472: 237-281.
177. Hazel JR. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 19-42.
178. Pownall HJ, Massey JB, Kusserow SK, Gotto AM Jr. Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholines. *Biochemistry* 1978; 17: 1183-1188.
179. Epand RM, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Thermodynamics of the binding of human apolipoprotein A-I to dimyristoylphosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 1990; 265: 20829-20832.
180. Mahadevappa VG, Holub BJ. The molecular species composition of individual diacyl phospholipids in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982; 713: 73-79.
181. Nathan I, Fleischer G, Livne A, Dvilansky A, Parola AH. Membrane microenvironmental changes during activation of human blood platelets by thrombin. *J Biol Chem* 1979; 254: 9822-9828.
182. Rodgers W, Glaser M. Characterization of lipid domains in erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1364-1368.
183. Prenner E, Sommer A, Kungl A, Stütz H, Friedl H, Hermetter A. Inequivalence of fluorescent choline and ethanolamine phospholipids in the erythrocyte membrane – fluorescence life-time determination in the frequency and time domain. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 473-476.
184. Higgins DL, Callahan PJ, Prendergast FG, Nesheim ME, Mann KG. Lipid mobility in the assembly and expression of the activity of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1985; 260: 3604-3612.
185. Marcus AJ, Ullman HL, Safier LB. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lip Res* 1969; 10: 108-114.
186. Horigome K, Hayakawa M, Inoue K, Nojima S. Purification and characterization of phospholipase A₂ released from rat platelets. *J Biochem* 1987; 101: 625-631.
187. Yokoyama K, Kudo I, Inoue K. Phospholipid degradation in rat calcium-ionophore-activated platelets is catalyzed mainly by two discrete secretory phospholipase As. *J Biochem* 1995; 117: 1280-1297.
188. Furcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A₂ generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; 80: 919-927.
189. Ashe BM, Zimmerman M. Specific inhibition of human granulocyte elastase by cis-unsaturated fatty acids and activation by the corresponding alcohols. *Biochem Biophys Res Comm* 1977; 75: 194-199.
190. Berton A, Rigot V, Huet E, Decarme M, Eeckhout Y, Patthy L, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G, Emonard H. Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2001; 276: 20458-20465.
191. Huet E, Cauchard JH, Berton A, Robinet A, Decarme M, Hornebeck W, Bellon G. Inhibition of plasmin-mediated prostromelysin-1 activation by interaction of long chain unsaturated fatty acids with kringle 5. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 643-654.
192. Higazi AAR, Aziza R, Samara AAR, Mayer M. Regulation of fibrinolysis by non-esterified fatty acids. *Biochem J* 1994; 300: 251-255.
193. Kohnert U, Rudolph R, Verheijen JH, Weeningverhoeff EJD, Stern A, Opitz U, Martin U, Lill H, Prinz H, Lechner M, Kresse GB, Buckel P, Fischer S. Biochemical properties of the kringle-2 and protease domains are maintained in the refolded tPA deletion variant BM 06.022. *Protein Eng* 1992; 5: 93-100.

194. Wiman B, Lijnen HR, Collen D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in α_2 -antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1979; 579: 142-154.
195. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3rd edn., 2004, Portland Press, London.
196. Duggleby RG. Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. *Methods Enzymol* 1995; 249: 61-90.
197. Duggleby RG. Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions. *Methods* 2001; 24: 168-174.
198. Barshop BA, Wrenn RF, Frieden C. Analysis of numerical methods for computer simulation of kinetic processes: development of KINSIM--a flexible, portable system. *Anal Biochem* 1983; 130: 134-145.
199. Zimmerle CT, Frieden C. Analysis of progress curves by simulations generated by numerical integration. *Biochem J* 1989; 258: 381-387.
200. Király O, Wartmann T, Sahin-Tóth M. Missense mutations in pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause intracellular retention and degradation. *Gut* 2007; 56: 1433-1438.
201. Shampine LF, Gladwell I, Thompson S. *Solving ODEs with Matlab*. 2003, Cambridge University Press, Cambridge
202. Cornish-Bowden A. Detection of errors of interpretation in experiments in enzyme kinetics. *Methods* 2001; 24: 181-190.
203. Selwyn MJ. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochim Biophys Acta* 1965; 105: 193-195.
204. Shapiro SS. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med* 1996; 47: 533-553.
205. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipids syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
206. Pierangeli SS, Chen PP, González EB. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: an update on treatment and pathogenic mechanisms. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 366-375.
207. Rand JH, Wu XX. Antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a new mechanism for thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1999; 82: 649-655.
208. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid syndrome: antibodies, antigens and autoimmune response. *Thromb Haemost* 1999; 82: 656-661.
209. Cugno M, Dominguez M, Cabibbe M, Bisiani G, Galli M, Angles-Cano E, Agostoni A. Antibodies to tissue-type plasminogen activator in plasma from patients with primary antiphospholipid syndrome. *Brit J Haematol* 2000; 108: 871-875.
210. Dominguez M, Cacoub P, de la Torre IG, Piette JC, Salazar-Paramo M, vGodeau P, Angles-Cano E. Autoantibodies to receptor induced neoepitopes of fibrinolytic proteins in rheumatic and vascular diseases. *J Rheumatol* 2001; 28: 302-308.
211. Puurunen M, Palosuo T, Lassila R, Anttila M, Vaarala O. Immunological and hematological properties of antibodies to prothrombin and plasminogen in a mouse model. *Lupus* 2001; 10: 108-115.
212. Yang CD, Hwang KK, Yan WH, Gallagher K, FitzGerald J, Grossman JM, Hahn BH, Chen PP. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin. *J Immunol* 2004; 172: 5765-5773.
213. Hwang KK, Grossman JM, Visvanathan S, Chukwuocha RU, Woods VL Jr, Le DT, Hahn BH, Chen PP. Identification of anti-thrombin antibodies in the

- antiphospholipid syndrome that interfere with the inactivation of thrombin by antithrombin. *J Immunol* 2001; 167: 7192-7198.
214. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.

10. Mellékletek: Az értekezés alapjául szolgáló közlemények